

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 133—147, März 1969

Über die Porphyrinsynthese in der Leberzellkultur unter der Einwirkung von Pharmaka und Steroiden¹⁾

Von M. Doss

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg/Lahn (Direktor: Prof. Dr. R. Siegert)

(Eingegangen am 27. Dezember 1968)

Herrn Prof. Dr. Brugsch zum 60. Geburtstag gewidmet

Es wird über die Wirkung verschiedener Pharmaka und Steroide auf die Porphyrinsynthese in primären Hühnerembryo-Leberzellkulturen berichtet:

1. Zunächst wird ein Verfahren zum Anlegen primärer Hühnerembryo-Leberzellkulturen beschrieben. Die Isolierung der Porphyrine erfolgte aus der gefriergetrockneten Zellkultur dünnschichtchromatographisch als Methylester, die nach Elution spektrophotometrisch als Cu-Chelat-Komplexe bestimmt wurden.
2. Pharmaka verschiedener chemischer Gruppen sowie Steroidmetabolite aus dem Stoffwechsel der Sexualhormone führten in den Leberzellkulturen zu einer Erhöhung der Porphyrinsynthese, wobei vorwiegend Protoporphyrin entstand.
3. Versuche mit Meprobamat und Ätiocholanolon zeigten, daß der Anstieg des Proto- und Koproporphyrins von der Konzentration der zugesetzten Substanz abhängig ist. Geschädigte Zellen synthetisierten nur bis zum Koproporphyrin.
4. Der die Porphyrinsynthese stimulierende Prozeß wurde einerseits durch Protohäm und andererseits durch Actinomycin D, Mitomycin C und Puromycin unterdrückt. Demzufolge wird die Steigerung der Porphyrinsynthese durch Pharmaka und Steroide auf eine Derepression der δ -Aminolävulinat-Synthetase, des limitierenden Enzyms der Hämbiosynthese, zurückgeführt.
5. Aus zugesetzter δ -Aminolävulinat wurden unter der Einwirkung von *p*-Hydroxy-phenylbutazon mehr Uroporphyrin und von Methyprylon mehr Koproporphyrin synthetisiert. Inhibitoren der Nucleinsäure- und Proteinsynthese beeinflussten diesen Effekt der Pharmaka auf die Porphyrinsynthese aus δ -Aminolävulinat nicht.
6. In mit stark induzierend wirkenden Substanzen beschickten Kulturen wurden simultan mit dem Anstieg des Protoporphyrins ein höherer Protohämingehalt durch differenzspektrophotometrische Analysen gefunden. Die Leberzellen, die in einem mit δ -Aminolävulinat oder Protoporphyrin supplementierten Medium inkubiert wurden, enthielten mehr Protohäm als Kulturen ohne diese Zusätze. Daraus wird geschlossen, daß die in Kultur inkubierten Leberzellen Protohäm synthetisieren.
7. Die Ergebnisse der pharmaka- und steroidinduzierten Porphyrinsynthese *in vitro* werden zur Pathogenese der genetisch determinierten hepatischen Porphyrien des Menschen in Beziehung gesetzt. Wahrscheinlich ist eine Störung der molekularen Kontrollmechanismen der Hämsynthese bei diesen Krankheiten von ursächlicher Bedeutung. Die durch Pharmaka und Steroide ausgelöste Manifestation ist sekundär und basiert auf der *in vivo* und *in vitro* nachgewiesenen Wirkung der Substanzen auf die Porphyrinsynthese.
8. Die Induktion der Porphyrinsynthese ist wie die Induktion arzneimittelabbauender Enzyme ein unspezifischer Prozeß. Beiden Prozessen gemeinsame Befunde werden herausgestellt und beide Prozesse verbindende funktionelle Mechanismen besprochen.

Porphyrin synthesis in liver cell culture and the effect of drugs and steroids

Results are reported on the action of various pharmaceutical substances and steroids on porphyrin synthesis in primary chicken embryo liver cell cultures:

1. First a method is described for the initiation of primary chicken embryo liver cell cultures. The porphyrins were isolated from freeze-dried cell cultures by thin layer chromatography of their methyl esters. The methyl esters were then eluted and converted into the Cu-chelate complexes, which were determined spectrophotometrically.
2. Several drugs of various classes and steroid metabolites of the sex hormones caused an increase in the synthesis of porphyrins in liver cell cultures and the main product was protoporphyrin.
3. Experiments with meprobamate and aetiocholanolone showed that the increase of copro- and protoporphyrin is dependent on the concentration of the added substance. Damaged cells can only achieve the synthesis as far as coproporphyrin.
4. The stimulation of porphyrin synthesis was suppressed by protohaem and by actinomycin D, mitomycin C and puromycin. From this it is concluded that the stimulation of porphyrin synthesis by pharmaceuticals and steroids is the result of the derepression of δ -amino-laevulinic acid synthetase, the limiting enzyme of haem biosynthesis.
5. In the presence of *p*-hydroxy-phenylbutazone, more uroporphyrin was synthesised from added δ -amino-laevulinic acid, and in the presence of methyprylone more coproporphyrin was synthesised; this phenomenon was not affected by the inhibition of nucleic acid and protein synthesis.
6. In cultures containing strongly inducing substances, differential spectrophotometric analysis showed that the increase in protoporphyrin was accompanied by a simultaneous increase in protohaemin. Liver cells incubated in a medium supplemented with δ -amino-laevulinic acid or protoporphyrin contained more protohaemin than cultures without these additions. From this it is concluded that the cultured liver cells synthesise protohaem.
7. The results from the induction of porphyrin synthesis by certain drugs and steroids *in vitro* are discussed in relationship to the pathogenesis of genetically determined hepatic porphyrias in humans. These diseases are probably caused by the disturbance of the molecular control mechanisms of haem synthesis. The condition induced by drugs and steroids is secondary and due to the action of these substances on porphyrin synthesis, which has been demonstrated *in vivo* and *in vitro*.
8. The induction of porphyrin synthesis is unspecific, resembling in this respect the induction of enzymes that degrade pharmaceutical substances. Findings common to both processes are presented and a unifying mechanism for both processes is discussed.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Zahlreiche Fremdstoffe, die größtenteils als Pharmaka in der klinischen Medizin Verwendung finden, steigern die Porphyrinbiosynthese in primären Hühnerembryo-Leberzellkulturen (1). Der Befund wurde in Anlehnung an die Hypothese über die Gen-abhängigen Mechanismen der Protein-Enzym-Synthese und ihrer Kontrolle erklärt, wie sie JACOB und MONOD (2) aufgestellt haben und von LWOFF (3) zusammenfassend beschrieben worden sind. Das Vorkommen der beiden, heute als Arbeitshypothesen relevanten Regelmechanismen, der zellulären („genetischen“) und der „epigenetischen“ (4, 5) Hemmung für den Reaktionsablauf der Hämsynthese, hat LASCELLES (6) an dem photosynthetischen Bakterium *Rhodospseudomonas sphaeroides* festgestellt. In der Leberzelle ist nach den Ergebnissen von GRANICK (1) nur der Regulationsmechanismus einer Repression vorhanden, wobei nach POTTER (4) „the term ‘repression’ has been used to describe feedback at the level of enzyme formation and ‘negative feedback’ has been used in a restricted sense to mean only the inhibition of enzyme activity“. Die Kontrolle vollzieht sich bei photosynthetischen Bakterien (6, 7) und bei dem aeroben Keim *Achromobacter metalcaligenes* (8) sowie in Proerythroblasten (9) und in der Leberzelle, sowohl in der des Hühnerembryos (1) als auch des Menschen (10), an der Bildung des ersten Enzyms der Hämbiosynthese, der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase, die somit als Schlüsselenzym für diese Stoffwechselkette fungiert.

Die Fähigkeit zur Derepression der Porphyrinsynthese ist allerdings keine spezifische Eigenschaft der Pharmaka und anderer chemischer Fremdstoffe, sondern sie wird ebenfalls durch eine Anzahl stereoisomerer biologischer Steroidmetabolite der Sexualhormone, die über eine cis-Konfiguration der A:B-Ringe (5β -H-Typ) verfügen, ausgelöst (11, 12). Diese Steroide induzieren die Porphyrinsynthese aber nicht nur in der Leberzelle. In Kulturen erythroider Zellen aus Hühnerblastoderm konnte die Häm- und Hämoglobinsynthese durch dieselben physiologischen Steroide, welche die Porphyrinsynthese in der Leberzelle steigern, stimuliert werden (13). Die Autoren (13) stellten die Arbeitshypothese auf, daß Steroide physiologischerweise in die Kontrollmechanismen der Hämsynthese sämtlicher Zellen eingreifen und den Repressionsvorgang durch eine Kompetition mit dem Corepressor steuern.

Neben der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase kommen als weitere regulative Enzyme für die Hämsynthese ein induzierbares Isoenzym der Succinyl-CoA-Synthetase²⁾ in der Leberzelle (14) und bei *Rhodospseudomonas sphaeroides* auch die δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase²⁾, deren mit der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase koordinierte Repression durch Hämin erfolgt (15), in Betracht. Die δ -Aminolävulinsäure-Synthetase wird außerdem sowohl

bei *Rhodospseudomonas sphaeroides* (16) als auch in Suspensionen intakter und lysierter Kaninchen-Retikulocyten (17) auf der Stufe des epigenetischen feedback-Systems durch Hämin gehemmt. Eine solche direkte Hemmung der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase durch Häm wurde weiterhin an isolierten Mitochondrien von Kaninchen-Retikulocyten (18) und in kinetischen Studien einer mitochondrialen Präparation des Enzyms aus Hühner-Retikulocyten (19) gefunden. Ein analoger Wirkungsmechanismus von Häm auf das nächste Enzym der Porphyrinsynthese, die δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase, wurde an den Erythrocyten des Menschen beobachtet (20). Nach Untersuchungen an den Knochenmarkzellen des Menschen wird der letzte Schritt der Hämsynthese ebenfalls durch einen negativen „feedback“ auf die Aktivität der Ferrochelatase²⁾ durch Häm kontrolliert (21).

Bei den Untersuchungen über die Porphyrinsynthese in der Leberzelle blieben die Fragen offen, welche Porphyrine von der Synthesesteigerung betroffen werden, und wie sich der Anstieg der einzelnen Porphyrine quantitativ vollzieht. Als biologisches Versuchssystem wurde die primäre Zellkultur aus Hühnerembryoleber gewählt. Mit der Entwicklung eines dünn-schicht-chromatographischen Verfahrens zur Differenzierung sämtlicher, im biologischen Material vorkommenden Porphyrine (22), verbunden mit einer empfindlichen spektrophotometrischen Bestimmung (23), wurde es möglich, die Biosynthese der individuellen Porphyrine in kleinsten Mengen zu verfolgen. Über einige Ergebnisse dieser Experimente an Leberzellkulturen wurde bereits referiert (24, 25). In dieser Arbeit wird neben einer Beschreibung der Methoden über die Wirkung einiger Pharmaka und Steroide auf die Porphyrinsynthese in der primären Zellkultur von Hühnerembryo-Leberzellen berichtet.

Material und Methoden

Chemikalien

Porphyrinvergleichssubstanzen wurden als Methylester nach eigenen Verfahren aus porphyrischem Urin oder proliferierenden Zellsuspensionen von *Achromobacter metalcaligenes*, die Porphyrine aus zugesetzter δ -Aminolävulinsäure 1 mm (Fluka AG., Buchs, Schweiz) synthetisierten, isoliert. Protohäm-dimethylester wurde aus Häminchlorid gewonnen (26).

Diallylbarbitursäure, Chloroquindiphosphat und Diäthyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridin-3,5-dicarboxylat (3,5-Dicarbäthoxy-1,4-dihydrocollidin, DDC; K & K Laboratories, Inc., Plainview, N. Y., Hollywood) wurden über Serva (Heidelberg) bezogen. Die übrigen Pharmaka stellte die pharmazeutische Industrie in Form von Reinsubstanzen zur Verfügung. Steroide wurden teilweise von Schering AG. (Berlin) erhalten und von E. Merck AG. (Darmstadt) und Fluka AG. (Buchs) bezogen.

Die Medien zum Anlegen der Zellkulturen (27) stellte die virologische Abteilung (Doz. Dr. F. LEHMANN-GRUBE) des Hygiene-Institutes zur Verfügung.

Zur Dünnschichtchromatographie verwendeten wir Kieselgel-Fertigplatten mit einer Schichtdicke von 0,25 mm (E. Merck). Die spektrophotometrischen Analysen wurden mit einem Spektralphotometer DB-G der Firma Beckman (München) durchgeführt.

Hühnerembryo-Leberzellkulturen

Die Zellkulturen wurden nach den von LEHMANN-GRUBE (27) angegebenen Richtlinien angelegt. Die Leber 17 Tage alter

²⁾ Enzyme: Succinyl-CoA-Synthetase (EC 6.2.1.4), δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase (EC 4.2.1.24), Ferrochelatase (EC 4.99.1.1); Uroporphyrinogen-Decarboxylase = Uroporphyrinogen-III-Carboxy-lyase (EC 4.1.1.37); Tryptophan-Pyrrolase (EC 1.13.1.12).

Hühnereibryonen wurde steril entnommen, mit Hilfe scherenartig gekreuzter Skalpelle in physiologisch balancierter Salz-Glucose-Lösung (BSL) von HANKS (28) bei $+4^{\circ}$ so weit zerkleinert, daß eine breiartige Gewebssuspension entstand, die man nach zweimaligem Waschen in BSL ($+4^{\circ}$) in einem Trypsinierungs-kolben (Abb. s. l. c. 27) überführte. Das Lebergewebe wurde nun mit einer auf 37° gebrachten 0,2proz. Trypsinlösung (29) in BSL unter langsamem Rühren der Suspension auf einem Magnet-rührer zu Einzelzellen zerlegt. Nach je 10 Min. wurde die Suspension mit den freigesetzten Zellen über einen Seitenarm des Kolbens durch einen mit fünf Lagen Gaze belegten Trichter in eine Sammelflasche filtriert und bei $+4^{\circ}$ gehalten. Mit frischer Trypsinlösung wurde die Auflösung der im Kolben zurückgebliebenen Gewebeteilchen fortgesetzt. Die Dauer der Trypsinierung betrug etwa eine Std. Um aus 40 Lebern Einzelzellen zu erhalten, benötigte man etwa 1,5 l Trypsinlösung. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert ($+4^{\circ}$, 50 g, 3 Min.) und nach Absaugen des Überstandes in 20 bis 30 ml Wuchsmedium, das 5proz. NaHCO_3 -Lösung enthielt, resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl durch Auszählen der Leberzellen eines mit Kristallviolett-Lösung (cf. 27) gefärbten Aliquots (0,5 ml Zellsuspension $+4,5$ ml Kristallviolett-Lösung; Anfärbung der Zellkerne) in einer Neubauer-Zählkammer wurde die Suspension, die neben Leberzellen auch einige Erythrocyten und Zelltrümmer enthielt, zu einer Dichte von 10^6 Leberzellen/ml mit dem Wuchsmedium verdünnt. Das Wuchsmedium bestand aus EAGLES Medium (30), supplementiert mit 0,5% Lactalbumin-Hydrolysat (27) und 10% Kälberserum. Je eine Mega-Einheit Penicillin und 1 g Streptomycin wurden auf 500 ml Medium hinzugefügt. Zur Kultivierung gelangten je 5 ml Zellsuspension einer Dichte von 10^6 Zellen/ml Wuchsmedium in kleinen Petrischalen (60×15 mm). Aus 40 Lebern konnten etwa 150 Kulturen gewonnen werden. Die Anzüchtung der Leberzellkulturen wurde im Wasser-mantelbrutschrank bei $37-37,5^{\circ}$ in einer Atmosphäre von 5% CO_2 in Luft durchgeführt. Bereits nach wenigen Stunden befand sich der überwiegende Teil von Leberzellen am Glas und bildete monolayer-Kolonien. Einen homogenen und lückenlosen Zellrasen entwickelten die Kulturen jedoch auch zu einem späteren Zeitpunkt selten. Die Kulturen wurden meistens nicht länger als 50 Stdn. inkubiert, wobei man das Medium mit demselben Wuchsmedium in der Regel nach 20 bis 24 Stdn. wechselte. Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Zellen mit einem schmalen Gummischaber vom Glas gelöst. Die Zellsuspension überführte man in ein Veresterungsgefäß (180×16 mm, NS 14,5), in dem sie zur Gefrier-trocknung schräg eingefroren wurden. Für eine getrennte Aufarbeitung von Zellen und Medium wurden die Zellen vorher sedimentiert (2000 g, 5 Min.) und Zellen sowie Medium separat lyophilisiert.

Darstellung und Extraktion der Porphyrinmethylester

Die Porphyrine und das Hämin wurden in den gefriergetrockneten Proben mit je 5 ml Methanol- H_2SO_4 (95:5 v/v) in 10 Stdn. bei Raumtemperatur verestert und als Methylester (ME) mit Chloroform extrahiert, wobei sich das folgende Vorgehen bewährte: Dem Methanol-Schwefelsäuregemisch wurden 2 ml CHCl_3 hinzugefügt. Dann filtrierte man die Mischung durch ein Faltenfilter (\varnothing 9 cm) in ein Extraktionsgefäß (190×20 mm, NS 14,5), spülte das Veresterungsgefäß mit 5 ml Chloroform-Methanol (4:1, v/v) nach und überführte diese ebenfalls durch das Filter in das Extraktionsgefäß. Nach Zusatz von 15 ml dest. Wasser wurde das Gefäß 3 Min. geschüttelt. Nachdem eine vollständige Phasentrennung eingetreten war, wurde die Chloroformphase mit einem zu einer Kapillare ausgezogenen Glasrohr abgezogen und in ein Sammelgefäß (180×16 mm, NS 14,5) überführt. Darauf folgten eine Extraktion mit je 5 ml und noch zwei Extraktionen mit je 3 ml Chloroform, so daß mindestens vier Extraktionen durchgeführt wurden, wobei die Porphyrin-ME quantitativ in die Chloroformphase übergegangen waren. Bei geringen Porphyrinkonzentrationen ist der Nachweis der Rotfluoreszenz der Chloroform-extrakte im UV-Licht (366 nm) nicht möglich. Bei Porphyrinkonzentrationen, die bereits im UV-Licht nachgewiesen werden können, wurden Intensität und Anzahl der Extraktionen vom

Fluoreszenznachweis abhängig gemacht. Bei den Kulturen, denen δ -Aminolävulinsäure zugesetzt worden war, kam man in der Regel mit fünf bis sechs Extraktionen aus. Die beim Anziehen des Chloroforms aus dem Extraktionsgefäß mitgenommenen geringen Volumina der wäbr. oberen Phase wurden mit einer spitzen Kapillare soweit wie möglich vollständig entfernt, ehe man die organische Phase mit möglichst wenig (ein bis zwei Spatelspitzen) Na_2SO_4 trocknete. Fünf Min. nach Zugabe des Na_2SO_4 wurde der Chloroformextrakt durch ein Faltenfilter (\varnothing 9 cm), in das zusätzlich etwas Na_2SO_4 gegeben wurde, in ein 25-ml-Spitz-kölbchen filtriert und eingedampft. Das Sammelgefäß wurde zweimal mit 5 ml warmem Chloroform (37°) nachgespült, die ebenfalls in das gleiche Kölbchen filtriert und eingedampft wurden. Zusatzversuche ergaben, daß die Ausbeuteverluste bei diesem Extraktionsverfahren unter 5% liegen.

Dünnschichtchromatographie

Der mit etwa 0,25 ml CHCl_3 wieder gelöste Tetrapyrrol-ME-Extrakt einer Probe wurde auf eine DC-Kieselgel-Fertigplatte mit einer Schichtdicke von 0,25 mm in Form eines etwa 3 cm breiten Streifens quantitativ aufgetragen. So konnten auf einer 20×20 cm großen Platte, die in der Mitte Vergleichssubstanzen führte, vier Proben appliziert werden.

Die zur Porphyrinchromatographie verwendeten Kieselgel-Platten waren nacheinander in den Lösungsmittelsystemen Chloroform-Methanol (2:1, v/v) und Benzol-Essigsäureäthylester (4:1, v/v) bis an den oberen Plattenrand vorgelaufen, um Verunreinigungen zu eliminieren, und sind anschließend wieder aktiviert worden (90° , 30 Min.). Dieses Vorlaufen der Platten bewährte sich, um eine photometrisch leerwertfreie Analyse der vom Adsorbens eluierten ME zu erhalten. Das Chromatogramm wurde nun in den folgenden Lösungsmittelsystemen stufenweise entwickelt (Abb. 1):

a) Chloroform-Methanol (130:20, v/v), zweimal 2 cm, danach vollständige Lufttrocknung. An der Lösungsmittelfront Bildung der neuen Startzone der Porphyrin-ME.

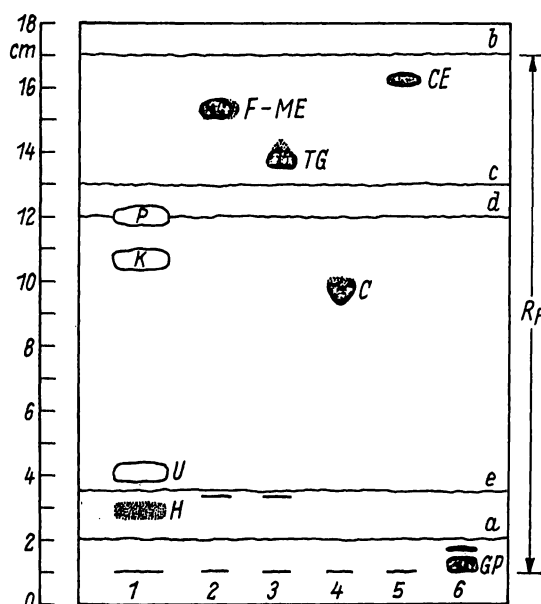


Abb. 1

Chromatographie der Porphyrinmethylester auf Kieselgel-Fertigplatten F_{254} von 0,25 mm Schichtdicke. Lösungsmittelsysteme: a) Chloroform — Methanol (130:20, v/v), b) Petroläther — Diäthyläther (4:1, v/v), c) Benzol — Essigsäureäthylester — Methanol (85:13,5:1,5, v/v), d) Benzol — Essigsäureäthylester — Butanol — Methanol (85:14:3:1, v/v), e) Chloroform — Methanol (100:5, v/v). Lipide, die im Porphyrinmethylester-Chloroformextrakt aus biologischem Material vorhanden sein können, werden abgetrennt. 1 Protohämin- (H), Uroporphyrin- (U), Koproporphyrin- (K) und Protoporphyrinmethylester (P), 2 Fettsäuremethylester, 3 Triglyceride, 4 Cholesterin, 5 Cholesterinester, 6 Glycerophosphatide. Unter der Lösungsmittelfront e bei 2 und 3 freie Fettsäuren. Nachweis der Porphyrine durch Fluoreszenz (Anregung mit langwelligem UV-Licht), des Hämins durch dunkelbraune Eigenfarbe und der Lipide durch Einsprühen der Zonen mit 30proz. Schwefelsäure und Erhitzen auf 120° .

- b) Petroläther (Siedebereich 40–60°) — Diäthyläther (4:1, v/v), 16 cm.
 c) Benzol-Essigsäureäthylester-Methanol (85:13,5:1,5, v/v), 12 cm, Lufttrocknung.
 d) Benzol-Essigsäureäthylester-Butanol-Methanol (82:14:3:1, v/v), 11 cm.
 e) Chloroform-Methanol (100:5, v/v), zweimal 2–3 cm.

Im Lösungssystem b) laufen Lipide (Cholesterinester, Triglyceride, Fettsäuremethylester) nahe der Front. Die Fettsäuremethylester entstanden unter diesen Bedingungen durch säurekatalysierte Umesterung von Glycerophosphatiden (31, 32) und Triglyceriden. Mit dem Lösungsmittelsystem c) werden die Porphyrin-ME vollständig getrennt, jedoch interferiert hier noch Koproporphyrin-ME mit Cholesterin. Diese beiden Substanzen werden durch anschließende Entwicklung im Lösungsmittelsystem d) getrennt (Abb. 1). Mit dem Lösungsmittelsystem e) wird der Hämin-ME herausfraktioniert.

Porphyrin- und Hämin-ME wurden im Vergleich zu den mitgelaufenen Testsubstanzen markiert. Die Porphyrin-ME konnten durch ihre charakteristische Rotfluoreszenz unter dem UV-Licht (355 oder 366 nm) und Protohämin-ME als dunkelbrauner Fleck bzw. Streifen erkannt werden. Die Nachweisempfindlichkeit der Porphyrine im langwelligen UV-Licht ist weitgehend von der Qualität der UV-Lampe abhängig. Hochdruckbrenner mit dunkelblauem Glas sind am effektivsten. Als handelsübliches Gerät verwendeten wir den DESAGA-Intensiv-Strahler. Hiermit können auf dem lösungsmittelfeuchten Chromatogramm noch 2 ng Porphyrinmethylester auf einer Fläche von 10 mm² nachgewiesen werden. Aus den von der Glasplatte mit einer Skalpellklinge gelöst und mit Hilfe eines Stücks Aluminiumfolie in ein Faltenfilter (Ø 5,5 cm) übertragenen Kieselgelzonen eluierte man die Di- bis Pentacarboxyporphyrin-ME mit Chloroform (35°), Hexa- bis Oktacarboxyporphyrin-ME mit Chloroform-Methanol (9:1, v/v) und Protohämin mit auf 50° erhitztem Chloroform-Methanol (4:1, v/v). Die Lösungsmittel wurden durch Vakuumdestillation entfernt.

Spektrophotometrische Analysen

Die Porphyrin-ME wurden nach l. c. (23) als Cu-Chelate spektrophotometrisch gemessen. Protohämin-di-ME wurde als Pyridinhämochromogen im Differenzspektrum reduziert minus oxydiert (33) bestimmt (26). Hierzu wurde der Hämin-ME in 0,4 ml Pyridin gelöst und mit 1,6 ml 0,1N NaOH versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde kurz geschüttelt und das Volumen auf zwei Halbmikroküvetten (d = 2 cm) verteilt. Der einen Küvette („Referenz“) wurden 20 µl 3 mm K₃Fe(CN)₆ zur Oxydation, der anderen Küvette („Probe“) 1 bis 2 mg Na₂S₂O₄ zur Reduktion zugesetzt. Sofort anschließend wurde das Spektrum zwischen 600 und 500 nm bei zwei- bis fünffacher Spreizung der Transmissionsskala registriert und die Differenz der Extinktion zwischen dem Maximum der α-Bande bei 557 nm und dem Minimum zwischen den α- und β-Banden bei 541 nm bestimmt.

Die Konzentrationen der Porphyrine und des Protohämins wurden an Hand millimolarer Extinktionskoeffizienten der Cu-Chelate (23) und des Pyridinhämochroms (34) berechnet. Für Proto-porphyrinmethylester galt $\epsilon_{\text{nm}}^{404} = 277$, für das Pyridinhämo-chrom aus Protohäminmethylester $\epsilon_{\text{nm}} = 21,2$ (26).

Ergebnisse

Hühnerembryo-Leberzellkulturen

Die zum Ansetzen der Zellkulturen verwendete Leberzellsuspension war nicht völlig frei von Erythrocyten und Zelltrümmern. Die Erythrocyten gingen aber, ebenso wie Leberzellfragmente, nicht in den Zellkultur-rasen ein. Beim Wechsel des Wachstumsmediums nach 24 Stdn. wurden dann Erythrocyten, Zellfragmente und einzelne, nicht angewachsene Zellen entfernt. Eine Ver-

mehrung der Leberzellen in der Kultur wurde nach mikroskopischen Kontrollen nicht beobachtet. Sie ist, wie bereits GRANICK (1) berichtet hat, für die Induktion auch nicht erforderlich. Mikroskopische Unterschiede an den Leberzellen zwischen induzierten und nicht-induzierten Kulturen konnten im Laufe der zweitägigen Inkubation nicht festgestellt werden. Relativ große Mengen der induzierenden Substanzen führten zu Zellschäden: Risse in der Zellwand, Destruktion des Zellkerns. (Zellschäden dieser Art können auch nach zu schneller Zentrifugation und/oder hoher Temperatur des Brutschrankes auftreten, wie elektronenmikroskopische Kontrollen zeigten³⁾.)

Die Reaktionsfähigkeit der in Kultur gehaltenen Zellen zur Induktion ist nach 24 Stdn. am stärksten. Sie ist am dritten Tag, wenn auch schwächer, noch vorhanden. Danach geht die Eigenschaft der Zellen zur Induktion verloren. Andererseits kann auch in der frisch angesetzten Kultur eine Induktion ausgelöst werden, wofür man die Substanz entweder sofort bei Anlegen der Kulturen oder zu dem Zeitpunkt zusetzt, wenn der größte Teil der Zellen bereits am Glasboden der Zellkulturschale haftet, was in der Regel zwischen zwei und fünf Stdn. eingetreten ist. Zwar ist die Auswirkung der beiden Applikationszeiten vor dem Mediumwechsel auf die Porphyrinsynthese gering, doch sind die bereits am Glas angewachsenen Leberzellen besser zu induzieren, so daß in diesem Falle höhere Porphyrinkonzentrationen entstehen. Bei der Induktion nach dem Mediumwechsel (s. Methodik) wurde mit 2-Methyl-2-n-propyl-1,3-propandioldicarbamat (200 µg/ml Medium) eine maximal doppelt so hohe Porphyrinsynthese erzielt als bei der Applikation des Induktors drei Stdn. nach Ansetzen der Kulturen. Mit Steroiden wurde dagegen innerhalb desselben Versuchsansatzes keine wesentlich höhere Porphyrinsynthese bei der Induktion vor und nach dem Mediumwechsel gefunden. Während die Reaktionsfähigkeit der Zelle zur Induktion nach einer Inkubationszeit von drei Tagen verlorengelassen, bleibt ihre Fähigkeit, Porphyrine aus der δ-Aminolävulinsäure zu bilden, länger erhalten. Vier und auch fünf Tage alte Leberzellkulturen synthetisieren noch Uro- und kleine Mengen von Koproporphyrin aus zugesetzter δ-Aminolävulinsäure. Allerdings sind die Syntheseraten aus δ-Aminolävulinsäure gegenüber den sofort oder nach den ersten 24 Stdn. induzierten Zellen viel geringer.

Die absoluten Mengen der nach Induktion durch dieselbe in der gleichen Konzentration hinzugefügte Substanz synthetisierten Porphyrine unterlag einer Variationsbreite von etwa ± 30% in voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Dieser Bereich wurde mit Meprobamat (200 µg/ml Medium) ermittelt. Die Variabilität (1) der Analysendaten zwischen den einzelnen Versuchsreihen beruht auf biologischen Variationen in den Lebern der Hühnerembryonen,

³⁾ Freundlicherweise von Herrn Professor Dr. W. VOGELL, Institut für Physikalische Biologie und Elektronenmikroskopie der Universität Marburg/Lahn durchgeführt.

Unterschieden des jeweils verwendeten Kälberserums, verschieden langer Dauer der Trypsinierung und physikalischen Differenzen der Inkubationsbedingungen. Deshalb sind die absoluten Analysendaten nur innerhalb einer Versuchsreihe vergleichbar. Die in den Abbildungen 2, 3, 4 und 6 dargestellten Resultate wurden aus Versuchen erhalten, deren Bedingungen identisch waren.

Verteilung der Porphyrine zwischen Zellen und Medium

In den nicht-induzierten Kulturen war die Konzentration der Porphyrine bei den meisten Experimenten so niedrig, daß zu ihrer Bestimmung mehrere Extrakte gepoolt werden mußten. Dabei ergab sich aus chromatographischen Analysen, daß Protoporphyrin zum überwiegenden Teil in den Zellen und nur in Spuren im Überstand, dagegen Koproporphyrin zu etwa gleichen Teilen in Zellen und Überstand vorkommen. In den mit Meprobamat (200 µg/ml) induzierten Leberzellkulturen befanden sich Koproporphyrin zu 62%, Protoporphyrin zu 41% und Porphyrine mit 5 bis 8 Carboxylgruppen fast ausschließlich im Medium. δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen, die mit einer modifizierten (35) Methode nach MAUZERALL und GRANICK (36) bestimmt wurden, fanden sich zu 72% und 61% in den Zellen. Ein solcher Verteilungstyp der Produkte der Hämsynthese wurde auch unter dem Einfluß anderer streng induzierender Pharmaka wie Glutethimid und Methypyrilon sowie nach Induktion mit Ätiocholanolon gefunden. Die Gesamtsynthese des Protoporphyrins wurde in den Experimenten (s. Abb. 2 bis 6) in Zellen und Medium zusammen analysiert (s. Methodik).

Porphyrynsynthese im zeitlichen Verlauf der Inkubation

Der zeitliche Verlauf der Gesamtsynthese stimmt mit den Ergebnissen von GRANICK und KAPPAS (1, 11) überein, die in ihren Induktionsversuchen die Zunahme der Porphyrynsynthese fluoreszenzmikroskopisch verfolgt haben. Der Synthesanstieg begann in den meisten Experimenten zwischen sechs und neun Std. Entgegen der Erwartung, daß gemäß der Synthesekette der Porphyrine zuerst Uro-, dann Koproporphyrin und zuletzt Protoporphyrin gebildet werden, zeigten sämtliche Induktionsversuche an Leberzellkulturen, daß zuerst die Synthese von Protoporphyrin ansteigt (37), dessen Konzentration nach 20 Std. für die Intensität einer induzierten Substanz auf die Porphyrynsynthese in den Hühnerembryo-Leberzellen charakteristisch ist. Dem Anstieg des Protoporphyrins folgten das Tri-carboxyporphyrin, dann Koproporphyrin und bei Anwesenheit eines sehr starken Induktors nach 14 bis 16 Std. auch Uroporphyrin (37).

Induktion der Porphyrynsynthese durch Pharmaka

Die folgenden chemischen Fremdstoffe, vorwiegend Pharmaka, wurden Leberzellkulturen zugesetzt:

1. 2-Methyl-2-n-propyl-1,3-propandioldicarbamat (Meprobamat, 200 µg/ml).
2. 1,4-Dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-dicarbäthoxy-pyridin (Diäthyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridin-3,5-dicarbäthoxy-3,5-Dicarbäthoxy-1,4-dihydrocollidin, DDC 10 µg/ml).
3. 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methylpiperidin (Methypyrilon, 100 µg/ml).
4. α -Phenyl- α -äthylglutarsäureimid (Glutethimid, 40 µg/ml).
5. Diallylbarbitursäure (120 µg/ml).
6. 1-Phenyl-2-(*p*-hydroxyphenyl)-3,5-dioxo-4-n-butylpyrazolidin-monohydrat (*p*-Hydroxy-phenylbutazon, 200 µg/ml).
7. 7-Chlor-4-(4'-diäthylamino-1'-methylbutylamino)-chinolindiphosphat (Chloroquindiphosphat, 150 µg/ml).
8. 2-(Sulfanilamido)-4,5-dimethyloxazol (200 µg/ml).
9. Chloramphenicol (150 µg/ml).
10. Griseofulvin (25 µg/ml).
11. Tylosin (200 µg/ml).

Die Substanzen wurden in der angegebenen Konzentration den Kulturen nach dem Mediumwechsel (24 Std.) zugesetzt. Die verschiedenen Konzentrationen der Substanzen sind in Vorversuchen für die Induktion der Porphyrynsynthese an den Leberzellkulturen als besonders wirksam ermittelt worden. Chloroquindiphosphat, Chloramphenicol, Griseofulvin und Tylosin führten nur zu einem Anstieg des Protoporphyrins. Dagegen kam es unter Einwirkung stark induzierender Substanzen wie Meprobamat, DDC, Methypyrilon, Glutethimid, aber auch bei *p*-Hydroxy-phenylbutazon,

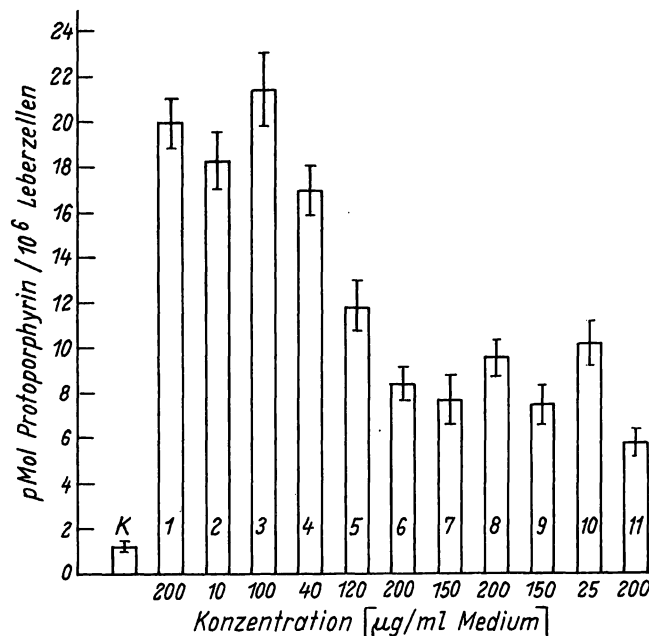


Abb. 2

Wirkung chemischer Fremdstoffe auf die Synthese von Protoporphyrin in Hühnerembryo-Leberzellkulturen. Zusatz der Substanzen in den angegebenen Mengen (µg/ml Medium) zu 24 Std. inkubierten Kulturen nach dem Wechsel des Wachstumsmediums. Analysen nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Std. Die Standardabweichung vom arithmetischen Mittel ($n = 4$) ist eingezeichnet. 1 Meprobamat, 2 3,5-Dicarbäthoxy-1,4-dihydrocollidin, 3 Methypyrilon, 4 Glutethimid, 5 Diallylbarbitursäure, 6 *p*-Hydroxy-phenylbutazon, 7 Chloroquindiphosphat, 8 2-(Sulfanilamido)-4,5-dimethyloxazol, 9 Chloramphenicol, 10 Griseofulvin, 11 Tylosin

ebenfalls zu einer Erhöhung des Kopro- und Uroporphyrins, deren Konzentration jedoch niemals signifikant über der Konzentration des Protoporphyrins nach 22stdg. Inkubation lag (37). Deshalb ist der Syntheseanstieg des Protoporphyrins für die Intensität der Induktion und damit für die Wirkung des Pharmakons auf die Porphyrinsynthese charakteristisch. Die Resultate sind in Abbildung 2 dargestellt. Das PPLO-Agens Tylosin führte auch bei Ratten nach peroraler Gabe zu dosisabhängigen passageren Erhöhungen der Ausscheidung von δ -Aminolävulinsäure, Porphobilinogen und Koproporphyrin im Urin (71).

Induktion durch Steroide

Der Einfluß folgender Steroide auf die Porphyrinsynthese wurde in den Leberzellkulturen untersucht:

1. 5β -Androstan- 3α -ol-17-on.
2. 5β -Androstan-3,17-dion.
3. 5β -Androstan-17 β -ol-3-on.
4. 5α -Androstan-17 β -ol-3-on.
5. 5β -Pregnan- 3α -17 α -20 α -triol.
6. 5β -Pregnan- 3α ,20 α -diol.
7. 5β -Pregnan-3,20-dion.
8. 5α -Pregnan-3,20-dion.
9. Δ^4 -Pregnen-3,20-dion.
10. $\Delta^{1,3,5}$ -Östratrien-3,17 β -diol.
11. Cholesterinoleat.
12. Cholsäure.

Die Konzentration der Steroide betrug $5 \mu\text{g/ml}$ Medium. Induzierende Steroide haben einen in quantitativer Hinsicht schwächeren Effekt auf die Porphyrinsynthese gegenüber den Pharmaka Meprobamat, Methpyrilon, Glutethimid sowie auch gegenüber 3,5-Dicarbäthoxy-1,4-dihydrocollidin. Dementsprechend trat eine erhöhte Bildung von Kopro- und Uroporphyrin ebenfalls nicht in dem Ausmaß, wie sie Meprobamat bewirkte, unter dem induzierenden Einfluß von Steroiden ein (37). Die Wirkung der verschiedenen Steroide auf die Synthese von Protoporphyrin ist in Abbildung 3 wiedergegeben. Außer Progesteron und Östradiol stimulierten vorwiegend 5β -H-Steroide (A:B-cis) die Porphyrinsyn-

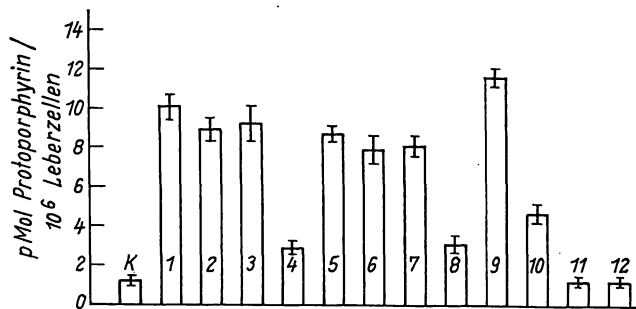


Abb. 3

Wirkung verschiedener Steroide auf die Synthese von Protoporphyrin in Hühnerembryo-Leberzellkulturen. Zusatz der Steroide während des Mediumwechsels nach 24 Stdn. Analysen ($\bar{x} \pm s\bar{x}$; $n = 4$) nach weiteren 24 Stdn. Inkubation. 1 5β -Androstan- 3α -ol-17-on, 2 5β -Androstan-3,17-dion, 3 5β -Androstan-17 β -ol-3-on, 4 5α -Androstan-17 β -ol-3-on, 5 5β -Pregnan- 3α ,17 α -20 α -triol, 6 5β -Pregnan- 3α ,20 α -diol, 7 5β -Pregnan-3,20-dion, 8 5α -Pregnan-3,20-dion, 9 Δ^4 -Pregnen-3,20-dion, 10 $\Delta^{1,3,5}$ -Östratrien-3,17 β -diol, 11 Cholesterinoleat, 12 Cholsäure, je $5 \mu\text{g/ml}$ Medium

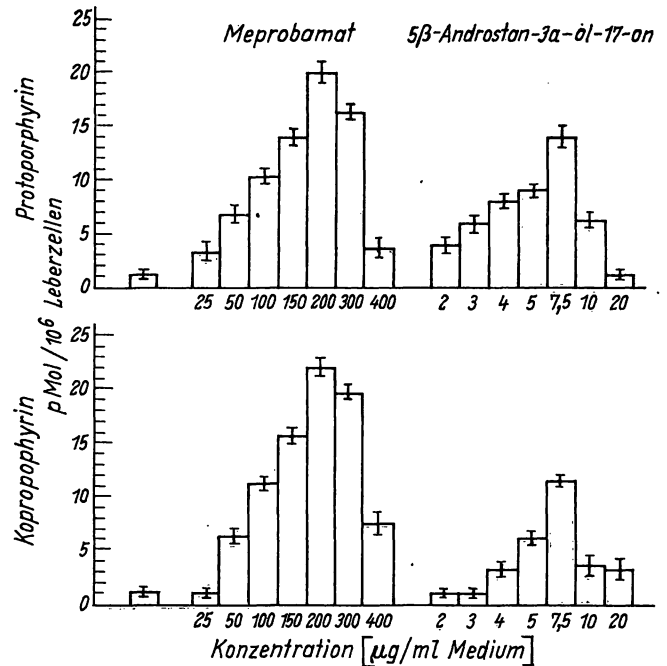


Abb. 4

Beziehung zwischen dem Syntheseanstieg des Protoporphyrins und der Konzentration der induzierenden Substanz im Medium der Leberzellkulturen

these. Die Resultate stimmen im wesentlichen mit den fluoreszenzmikroskopischen Befunden von GRANICK und KAPPAS (11, 12) überein.

Abhängigkeit der Induktion von der Konzentration der induzierenden Substanz

Meprobamat und Ätiocholanolon wurden den Zellkulturen in steigenden Mengen zugesetzt. Die Porphyrinsynthese stieg mit Zunahme der Konzentration des Induktors im Medium zunächst an und erreichte bei einer bestimmten Konzentration ein Maximum. Dieses Wirkungsmaximum lag für Meprobamat in mehreren Versuchen zwischen 200 und $250 \mu\text{g/ml}$ Medium und für Ätiocholanolon zwischen 5 und $7,5 \mu\text{g/ml}$. Die typischen Ergebnisse eines Versuchs zeigt Abbildung 4. Es handelt sich um Analysendaten von 24 Stdn. inkubierten Kulturen. Das Carbamat wirkte stärker als Ätiocholanolon. Die Proto- und Koproporphyrinsynthese verliefen zunächst gleichsinnig in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge des Induktors bis zu dessen Wirkungsmaximum. Hohe Konzentrationen der zugesetzten Substanzen führten hingegen zu morphologischen Veränderungen der Zelle (s. unter Zellkulturen S. 136). Geschädigte Zellen (Meprobamat $400 \mu\text{g/ml}$, Ätiocholanolon $20 \mu\text{g/ml}$) synthetisierten vorwiegend Koproporphyrin.

Der Effekt des Meprobamats ($200 \mu\text{g/ml}$ Zellsuspension) war in jedem Leberzellkulturversuch innerhalb der Variabilität des biologischen Systems reproduzierbar. Meprobamat wurde deshalb als „Indikator“-Substanz verwendet, um die Eignung der unter den Bedingungen der Zellkultur inkubierten Leberzellen für die Induktion der Porphyrinsynthese zu prüfen und die Syntheseleistung der einzelnen Versuche miteinander quantitativ zu vergleichen. Als eine Testsubstanz mit stark induzierenden Eigenschaften bot sich auch DDC an. Jedoch hat DDC für die hier

verwendete Aufarbeitungstechnik einige Nachteile, die darin bestehen, daß es nach der Veresterung ebenfalls durch Chloroform mitextrahiert und sich dünnschichtchromatographisch in mehrere Fraktionen auf trennt, die im UV-Licht (355 nm) intensiv hellblau fluoreszieren, mit den R_F -Zonen der Porphyrinmethylester, insbesondere des Kopro- und Protoporphyrins, interferieren und dadurch deren Nachweisempfindlichkeit einschränken. (Eine Abtrennung des DDC gelang durch Mehrfach-Chromatographie im Lösungsmittelsystem Benzol-Äthylacetat (9:1, v/v), wenn das Chromatogramm nicht vorher schon in anderen Lösungsmittelsystemen entwickelt worden war.)

Einfluß einiger Pharmaka und Steroide auf die Porphyrinsynthese aus δ -Aminolävulinsäure

Aus δ -Aminolävulinsäure, die in einer Konzentration von 0,1 mM mit dem Wechsel des Wachstumsmediums hinzugegeben wurde, synthetisieren Hühnerembryo-Leberzellen erheblich größere Mengen an Porphyrinen als nach Induktion durch Meprobamat oder DDC. Gegenüber den Zellkulturen (Kontrollen) ohne Zusatz von δ -Aminolävulinsäure wurden nach einer Inkubation von 24 Std. 100fach mehr Protoporphyrin, 30- bis 40fach mehr Koproporphyrin und etwa 20- bis 30fach mehr Uroporphyrin gefunden. In den Inkubationsperioden vor und nach dem Mediumwechsel wurden nicht nur unterschiedliche Mengen von δ -Aminolävulinsäure für die Porphyrinsynthese genutzt, sondern auch die Synthese der einzelnen Porphyrine selbst war verschieden groß. So ergab sich im Vergleich der Porphyrinkonzentrationen der Gesamtkultur nach 24 und 48 Std., also nach Zusatz von δ -Aminolävulinsäure bei der Inkubationszeit 0 und 24 Std., daß in der zweiten Inkubationsperiode die Synthese von Proto- und Uroporphyrin abnahm, obwohl diejenige von Koproporphyrin anstieg. Der Befund ist im Zusammenhang mit der Beobachtung zu erklären, daß drei Tage in Kultur inkubierte Leberzellen die Porphyrinsynthese nicht mehr bis zum Protoporphyrin durchführen können. Neben der Induzierbarkeit der δ -Aminolävulinsäuresynthetase nimmt auch die Aktivität der Koproporphyrin-Oxydase im Verlaufe der Kultivierung schneller ab als die Aktivitäten der δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase und des vom Uro- zum Koproporphyrinogen führenden Decarboxylierungs-Systems²). Die relativ geringe Uroporphyrinkonzentration bei der Synthese aus δ -Aminolävulinsäure am Ende der zweiten Inkubationsperiode resultiert, wie Verlaufsstudien der Synthesesequenzen zeigten, daraus, daß Uroporphyrinogen überwiegend zu Koproporphyrin metabolisiert wurde. Es ist anzunehmen, daß die mit dem Rückgang der Protoporphyrinsynthese synchron und auch quantitativ korrelierende Erhöhung der Koproporphyrinsynthese durch Regulationsmechanismen auf dem Niveau einer feedback-Kontrolle gesteuert wird. Wahrscheinlich versucht die Zelle, eine verminderte Fähigkeit zur Protoporphyrinsynthese durch einen verstärkten „Nachschub“ von höher carboxylierten Porphyrinogenen auszugleichen. Die Hypothese, daß in der Leberzelle zwischen den Synthesesequenzen, die von der δ -Aminolävulinsäure zum Protohäm führen, Kontrollmechanismen

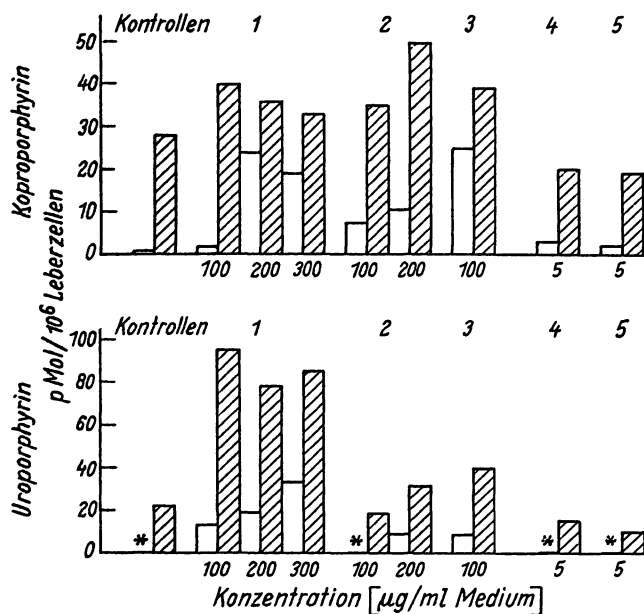


Abb. 5

Einfluß einiger Pharmaka und Steroide auf die Synthese von Kopro- und Uroporphyrin mit (schraffiert) und ohne (offene Säulen) Zusatz von δ -Aminolävulinsäure (ALS) zum Wachstumsmedium. Konzentration der ALS 0,1 mM. 1 Meprobamat, 2 p -Hydroxy-phenylbutazon, 3 Methylpyrrolon, 4 Progesteron, 5 Östradiol

Zeichenerklärung: * auf dem Chromatogramm kein Fluoreszenznachweis

existieren, wird weiterhin durch die Experimente gestützt, in denen sich zeigte, daß nach der Zugabe von Meprobamat (100–300 µg/ml) zur Zellkultur die Konzentration von Uroporphyrin und nach der Zugabe von p -Hydroxy-phenylbutazon (200 µg/ml) die Konzentration von Koproporphyrin anstieg (Abb. 5). Das relative Ausmaß des Anstiegs der Porphyrine aus zugesetzter δ -Aminolävulinsäure (0,1 mM) unter dem Einfluß von Pharmaka ist allerdings viel geringer als bei den Induktionsversuchen. Inhibitoren der Nucleinsäure- und Proteinsynthese (s. S. 140) hatten sowohl in den Kontrollen als auch in den mit Pharmaka beschickten Kulturen nur geringen Einfluß auf die Synthese aus δ -Aminolävulinsäure, so daß ein Induktionsprozeß demzufolge für den in Abbildung 5 dargestellten Pharmakaeffekt nicht verantwortlich sein wird. Außerdem ist δ -Aminolävulinsäure selbst ein potenter Repressor auf die δ -Aminolävulinsäure-Synthetase (15). Der größte Teil der unter Zusatz von δ -Aminolävulinsäure in der Hühnerembryo-Leberzelle gebildeten Porphyrine wird an das Medium abgegeben. In dieser Hinsicht verhält sich die Leberzelle ähnlich wie eine Bakterienzelle. Auch ein zur Hämsynthese fähiger Mikroorganismus gibt die aus dem Medium zugesetzte δ -Aminolävulinsäure synthetisierten Porphyrine, die aus diesem Vorläufer in verhältnismäßig großer Konzentration gebildet werden können, vorwiegend an das Medium ab (8). Wenn morphologisch und funktionell so extrem verschiedene Zellen in Bezug auf die Abgabe von Porphyrinen aus der Zelle ein im Prinzip gleichartiges Verhalten zeigen, liegt es nahe, daß sich hinter dieser Beobachtung eine allgemeine biologische Regel verbirgt.

Identifizierung von Protoporphyrin

Die Porphyrine wurden auf dem Dünnschichtchromatogramm gegenüber authentischen Vergleichssubstanzen lokalisiert. Zur Identifizierung mußten jedoch ausreichende Mengen an Reinsubstanzen zur Verfügung stehen, die durch Rechromatographie in denselben Lösungsmittelsystemen isoliert werden konnten. Die Substanzen wurden aus den Leberzellkulturen gewonnen, die Porphyrine aus zugesetzter δ -Aminolävulinsäure synthetisierten. Sowohl die R_F -Werte der einzelnen Porphyrine als auch die Absorptionsmaxima der Porphyrinmethylester in Chloroform und der Kupfer-Chelat-Komplexe stimmten mit den Daten der Vergleichssubstanzen überein. Die nach dem chromatographischen Verhalten in verschiedenen Lösungsmittelsystemen und den Absorptionsmaxima in Chloroform, Äther und Dioxan als Protoporphyrin-IX-dimethylester bezeichnete Substanz wurde mit der Eisensulfat-Methode (34) in Protohäm in und mit einer Bromwasserstoff-Eisessig-Lösung in Hämatoporphyrin umgewandelt (38). Protohäm inmethylester wurde chromatographisch gereinigt (22) und an Hand seines Differenzspektrums nachgewiesen (26). Die aus Protoporphyrin erhaltene Hämatoporphyrinfraction wurde rückverestert, und Hämatoporphyrin-IX-methylester wurde chromatographisch und spektrophotometrisch analysiert und wie früher beschrieben identifiziert (38).

Porphyrine mit 3, 5, 6 und 7 Carboxylgruppen

Unter der Einwirkung von Meprobamat (200–300 $\mu\text{g/ml}$), DDC (10 $\mu\text{g/ml}$) und Glutethimid (40 $\mu\text{g/ml}$) stieg nicht nur die Synthese der 2-, 4- und 8-Carboxyporphyrine an, sondern auch eine Fraction, die chromatographisch zwischen Proto- und Koproporphyrin wanderte und am ehesten ein Triacarboxyporphyrin darstellt. Außerdem befanden sich in diesen Zellkulturen Porphyrine mit 5, 6 und 7 Carboxylgruppen, die mittels Vergleichssubstanzen, die aus einer früheren Arbeit vorhanden waren (22), nachgewiesen werden konnten.

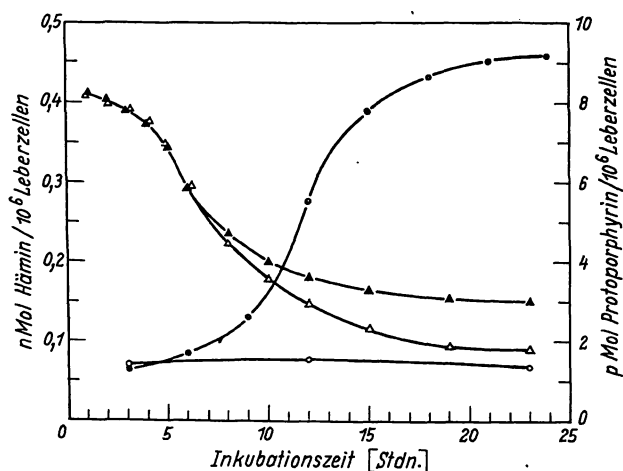


Abb. 6
Protohämgehalt der mit Meprobamat (150 $\mu\text{g/ml}$ Medium) induzierten Hühnerembryo-Leberzellkulturen im Vergleich zur Konzentration des gebildeten Porphyrins

Häm in \triangle
Kontrolle \circ
Meprobamat \square
Protoporphyrin \bullet

Protohämgehalt der Leberzellkulturen

Bei der Veresterung der Porphyrine und Extraktion der Porphyrinmethylester erhielt man gleichzeitig den Protohäm inmethylester, der ebenfalls vom Adsorbens eluiert und dann differenzspektrophotometrisch als Pyridinhämochrom analysiert wurde.

Aus Abbildung 6 geht hervor, daß die Protohäm inkonzentration in sämtlichen Kulturen vorwiegend während der ersten 10 Stdn. abfällt. Nach 10 Stdn., zu dem Zeitpunkt also, an dem die Protoporphyrinsynthese maximal ansteigt, fällt in den mit Meprobamat (Abb. 6), DDC, Glutethimid, Methpyrion und Diallylbarbitursäure induzierten Kulturen die Konzentration des Hämins gegenüber der Kontrolle geringer ab, so daß gegen Ende der Inkubationszeit ein höherer Protohäm ingehalt in der induzierten Kultur resultierte (26). Es ist noch zu beweisen, ob der Rückgang des Häm ingehaltes im Verlaufe der Inkubation lediglich durch den Abfall der Katalase entsteht und ob der erhöhte Gehalt an Protohäm in in der induzierten Kultur am Ende der Inkubation auf eine echte Neusynthese von Protohäm zu beziehen ist. Für eine Neusynthese spricht die Tatsache, daß in Kulturen mit 0,1 mM δ -Aminolävulinsäure in den letzten 10 Stdn. der Inkubationsperiode mehr Protoporphyrin gefunden wurde. Die Unterschiede im Häm ingehalt zwischen diesen und mit Meprobamat induzierten Kulturen, die ebenfalls δ -Aminolävulinsäure enthielten, waren aber nicht signifikant. Den Kulturen zugesetztes freies Protoporphyrin (1 bis 5 μM) wurde partiell in Häm überführt.

Einfluß von Protohäm in und Inhibitoren der Nucleinsäure- und Proteinsynthese

Setzt man den Kulturen gleichzeitig mit dem Pharmakon auch Häm in in Konzentrationen zwischen 10 und 100 μM zu, wird die Wirkung des Pharmakons weitgehend aufgehoben. In einer Konzentration von 50 μM hemmt Protohäm in, das in einer nach den Angaben von LASCELLES hergestellten Lösung (15) zugesetzt wurde, die durch Meprobamat induzierte Porphyrinsynthese um etwa 80%. Um eine direkte Reaktion zwischen Pharmakon und Häm in auszuschließen, wurden differenzspektrophotometrische Analysen von Protohäm in-Meprobamat-Gemischen in wäßrigen und organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Es fanden sich jedoch keine Hinweise, die auf eine Komplexbildung zwischen diesen beiden Substanzen schließen lassen. Inhibitoren der Nucleinsäuresynthese (39), wie Actinomycin D und Mitomycin C, verhindern den induzierenden Effekt von Pharmaka und Steroiden auf die Porphyrinsynthese. Die Wirkung der Inhibitoren ist dosisabhängig (12). Actinomycin D 0,1 $\mu\text{g/ml}$ oder Mitomycin C 10 $\mu\text{g/ml}$, die gleichzeitig mit Meprobamat, DDC, Glutethimid, Methpyrion oder Ätiocolanolon, 5 β -Androstan-17 β -ol-3-on und 5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,20 α -triol appliziert wurden, inhibierten den Anstieg der Porphyrinsynthese vollständig. Ebenfalls wurde in Zellkulturen, denen mit Meprobamat oder *p*-Hydroxyphenylbutazon (200 mg/ml) gleichzeitig Puromycin (39)

in einer Konzentration von $12 \mu\text{g}/\text{m}$ hinzugefügt wurde, nach 22 Std. kein von der Kontrollkultur abweichender Prophyrygehalt gefunden.

In vivo Experimente an Hühnerembryonen

16 Tage alten Hühnerembryonen wurden 5 mg Meprobamat in den Luftsack injiziert. Die Kontrollen erhielten das entsprechende Volumen des Lösungsmittels ($20 \mu\text{l}$ 0,85proz. NaCl/Äthanol 2:1, v/v). Nach 20 Std. wurden die Lebern von je drei Embryonen präpariert, zerschnitten, tiefgefroren, lyophilisiert und in Portionen von 10 bis 12 mg ausgewogen. Das Trockengewicht der Lebern lag bei 45 mg in den Kontrollen und bei den induzierten Embryonen um 16% höher. Auf dem Dünnschichtchromatogramm der aus Leberproben der Kontrollen aufgetrennten Extrakten war keine Porphyrinfluoreszenz feststellbar. Dagegen ließ sich im Chromatogramm der Leberextrakte von Embryonen, die Meprobamat erhalten hatten, Protoporphyrin und Koproporphyrin fluoreszenzoptisch nachweisen. Die Konzentration beider Porphyrine lag bei $5 \text{ pMol}/\text{mg}$ Trockengewicht.

Diskussion

Sowohl von klinischer wie von biochemischer Seite liegt eine große Anzahl von Befunden vor, die zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Pharmaka und organisch-chemischen Fremdstoffen auf die Porphyrinsynthese beim Menschen und am Versuchstier beigetragen haben. Zusammenfassende Darstellungen geben BRUGSCH (40), STICH (41, 42), GOLDBERG und RIMINGTON (43) und das CIBA FOUNDATION SYMPOSIUM im Jahre 1955 (44).

Mit den Erkenntnissen über die Gen-abhängige Steuerung von Regulationsmechanismen (2) biologischer Synthesen haben sich neue Vorstellungen nicht nur über die Wirkung von Pharmaka auf die Porphyrin- und Hämsynthese, sondern auch zur Pathogenese der hepatischen Porphyrien des Menschen herausgebildet (45). Hinzu kommen von pharmakologischer Seite Untersuchungen über die Induktion arzneimittelabbauender Enzyme (46, 47, 48) und über die Stimulation des Leberwachstums unter Fremdstoffeinwirkung (49, 50, 51), insbesondere bei experimenteller Porphyrie (52, 53, 54, 55), sowie elektronenmikroskopische Beobachtungen über Veränderungen an den Mitochondrien (56) und am endoplasmatischen Retikulum (57, 58, 59) unter der Wirkung von Pharmaka auf die Leber des Versuchstieres.

Besprechung der Experimente

Die ersten Hinweise auf eine de novo Synthese des ersten Enzyms der Hämsynthese in der Leber durch chemische Fremdstoffe, der eine Erhöhung der Porphyrinsynthese folgt, gaben GRANICK und URATA (56). Sie verfütterten an Meerschweinchen DDC, über dessen porphyrogene Wirkung beim Versuchstier erstmals SOLOMON und FIGGE (60, 61) berichtet hatten, und stellten in den

Mitochondrien der Leberparenchymzellen einen 40-fachen Anstieg der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase fest. Sie beobachteten bereits während der ersten Tage des Experiments in den Leberzellen eine Vergrößerung des Durchmessers der Mitochondrien und ebenfalls eine Vergrößerung der Cristae mitochondriales. Für eine Neusynthese des Enzyms sprach auch die Tatsache, daß die δ -Aminolävulinsäure-Synthetase in Inkubaten isolierter Mitochondrien mit löslichkeitsfördernden Zusätzen nicht direkt aktiviert werden konnte. Mit grundlegenden Untersuchungen brachte dann GRANICK (1, 62, 63) den Beweis, daß bestimmte chemische Fremdstoffe, Pharmaka und Sexualhormone, die im Tierexperiment und teilweise auch beim Menschen die chemischen Zeichen einer Porphyrie hervorrufen oder eine hepatische Porphyrie (64) klinisch exacerbieren können, die Porphyrinsynthese in der Leberzelle im Sinne einer Derepression des limitierenden Enzyms stimulieren. Darüberhinaus zeigten in vivo Experimente an Hühnerembryonen (vgl. S. 140), daß Lebermitochondrien, die 24 Std. nach einmaliger Applikation von 3 mg Allylisopropylacetamid (1) isoliert wurden, achtmal mehr δ -Aminolävulinsäure gegenüber Kontrollansätzen synthetisierten, wenn sie mit Succinat und Glycin als Substraten inkubiert wurden.

Den Anstieg der Porphyrinsynthese in dem in vitro System primärer Hühnerembryo-Leberzellkulturen hat GRANICK in den meisten Experimenten fluoreszenzmikroskopisch an Deckglas-Kulturen beurteilt (1). Wie aus zusätzlichen fluorometrischen Analysen von Extrakten (1) der Kulturen (Zellen und Medium) hervorging, waren die Porphyrine in mit Allylisopropylacetamid induzierten Kulturen nach einer Inkubationszeit von 22 Std. etwa 100fach erhöht. In den eigenen Experimenten (Abb. 2) stieg Protoporphyrin unter der Einwirkung stark induzierender Pharmaka in der Zellkultur um das 20- bis 30fache an. Summiert man jedoch den Anstieg von Proto-, Kopro- und Uroporphyrin nach Induktion durch Substanzen wie Meprobamat, DDC oder Methyprylon in denjenigen Konzentrationen, welche die Porphyrine nach 20 bis 24 Std. Inkubation erreichten (37) und berücksichtigt dazu noch die Anteile der von der Synthesesteigerung ebenfalls betroffenen Porphyrine mit drei, fünf, sechs und sieben Carboxylgruppen, die hier 20 bis 25% der Gesamtsynthese einnahmen, so ergibt sich eine 80fache Erhöhung der Porphyrinsynthese. Eine Übereinstimmung mit den Befunden von GRANICK (1) zeigt sich weiterhin im zeitlichen Verlauf der Porphyrinsynthese nach Applikation des Induktors und in der Reversibilität der Induktion, die dadurch nachgewiesen wurde, indem man das Medium zu einem Zeitpunkt zwischen drei bis neun Std. nach Zugabe der Substanzen abzog und durch frisches ersetzte. Wechselte man bei einer mit einem Induktor beschickten Kultur das Wachstumsmedium erst nach neun Std., also zu einem Zeitpunkt, in dem die Porphyrinsynthese bereits steil anstieg (37), betrug die Porphyrinkonzentration nach 24 Std. nur die Hälfte gegenüber einer Kultur, die die induzierende Substanz

während der gesamten Inkubationsperiode über 24 Std. enthielt. Obwohl die noch in Suspension befindlichen Zellen direkt nach Aussaat in die Zellkulturschale induziert werden konnte, erwies es sich als zweckmäßig, die porphyrigenen Substanzen erst nach 24 Std. bei einem Mediumwechsel hinzuzugeben, da

1. durch zwischenzeitliche mikroskopische Kontrollen die Qualität der Zellkultur beurteilt werden muß und

2. die Induzierbarkeit der am Glas befindlichen Zellschicht 12 bis 24 Std. nach Ansetzen der Kulturen am besten ist.

GRANICK (1) fand in den in Kultur gezüchteten und induzierten Leberzellen 80% Koproporphyrin. Der Rest bestand aus Di- und Tricarboxyporphyrinen. In den hier vorliegenden Untersuchungen (s. Ergebnisse, S. 137 und 139) dominierte die Protoporphyrinsynthese gegenüber dem Auftreten anderer Porphyrine sowohl im zeitlichen Verlauf der Inkubation als auch am Ende der Kultivierung in summa. Die Synthese von Protoporphyrin in der Leberzellkultur ist ein Maßstab für die Intensität des Induktionsprozesses (37). Protoporphyrin bildete den größten Anteil der Porphyrine in den Zellen, die unter Meprobamat nach 24 Std. insgesamt 70% der gesamten synthetisierten Porphyrine an das Medium abgegeben hatten.

Analog dem Experiment in der Leberzellkultur, wo infolge einer forcierten Synthese Protoporphyrin gegenüber höher carboxylierten Porphyrinen überwog, wurde über relativ hohe Konzentrationen von Protoporphyrin in der Leber des Versuchstieres bei experimenteller Porphyrie schon mehrfach berichtet. SCHMID und Mitarbeiter (65, 66) fanden in der Leber mit Sedormid vergifteter Kaninchen fünf- bis achtmal mehr Protoporphyrin gegenüber Kopro- und Uroporphyrin. Ebenfalls wurde in Leberhomogenaten mit DDC behandelte Meerschweinchen 90 bis 95% Protoporphyrin festgestellt; der Rest war Koproporphyrin (56). In ähnlichen Experimenten mit Mäusen, denen DDC oder 2-Allyl-2-isopropylacetamid verabreicht wurde, zeigte sich, daß die Leber unter den Bedingungen der experimentellen Porphyrie vorwiegend Protoporphyrin synthetisierte (52), das in einigen Fällen eine mehr als 10fache Konzentration gegenüber Koproporphyrin erreichte. Dagegen lag der Uroporphyringehalt erheblich niedriger. Der Verteilungstyp der Porphyrine (52) entspricht im Prinzip etwa demjenigen, wie er in eigenen Induktionsversuchen an Leberzellkulturen mit stark induzierenden Substanzen nach 12 Std. (37) und mit weniger effektiven Substanzen (z. B. Resochin, Sulfonamiden, Chloramphenicol, Griseofulvin; Östradiol) nach 24 Std. Inkubation vorlag. Auch die Verabreichung von Griseofulvin an jungen Ratten führte zu einer Überproduktion von Protoporphyrin in der Leber und im Knochenmark (67, 68). Außerdem war bei einem Patienten, der über mehrere Monate Griseofulvin erhalten hatte, der hepatozelluläre Gehalt an Protoporphyrin in dem durch Leberbiopsie gewonnenen Material erhöht (69). Diese Befunde zeigen, daß die durch Fremdchemi-

kalien induzierte Porphyrinsynthese in der Leberzelle in vivo und in vitro auffallend parallele Eigenschaften aufweist. Aus den Zeitstudien der Leberzellkultur-experimente (37) und aus den Ergebnissen der in vivo Versuche mit Sedormid (70) stellt sich die Frage, warum das Endprodukt der Porphyrinsynthese, Protoporphyrin, zuerst ansteigt. Eine Hemmung der δ -Aminolävulin-säure-Dehydratase-Aktivität im Leberhomogenat durch Protoporphyrin ist vermutet worden (52). BURNHAM und LASCELLES (16) berichten über einen hemmenden Einfluß von Protoporphyrin auf die δ -Aminolävulin-säure-Synthese in Präparationen der Synthetase aus Extrakten von *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Nach in vitro Experimenten (37) scheint eine solche Regulation in der Leberzelle nicht zu existieren, da ja erst dann, wenn die Konzentration von Protoporphyrin erheblich anstieg, Kopro- und später auch Uroporphyrin in größerer Menge gebildet wurden. Demzufolge ist hier eher an eine feedback-Hemmung auf die dem Reaktionsprodukt jeweils vorgeordneten Enzyme zu denken.

Mit Hämin, besonders in Konzentrationen zwischen 10 und 100 μ M, konnte die durch Pharmaka (Abb. 2) und Steroide (Abb. 3) ausgelöste Erhöhung der Porphyrinsynthese weitgehend unterdrückt werden. Der Befund steht im Einklang mit der Arbeitshypothese (1), daß Häm als Corepressor eines Repressorsystems in die Kontrolle über die Bildung der δ -Aminolävulin-säure-Synthetase eingreift. Da Protohäm die Tetrapyrrolsynthese bei Bakterien sowohl durch feedback-Repression als auch durch Inhibition kontrolliert (6, 16, 71), sind prinzipiell analoge Regelmechanismen der Tetrapyrrolsynthese für sämtliche Zelltypen, die über die Fähigkeit zur Hämoproteinsynthese aus niedermolekularen Bausteinen verfügen, zu postulieren. Analog der Beobachtung bei Bakterien (16) wurde in Lebermitochondrien von Ratten, denen zur Induktion der Synthetase Allylisopropylacetamid injiziert worden war, eine negative feedback-Kontrolle der δ -Aminolävulin-säure-Synthetaseaktivität durch Häm gefunden (18).

Die vollständige Unterdrückung der mit Pharmaka und Steroiden stimulierbaren Porphyrinsynthese in Leberzellkulturen durch Inhibitoren der Nucleinsäure- und Proteinsynthese, wie Actinomycin D, Mitomycin C und Puromycin in geeigneten Konzentrationen, stellt einen indirekten Beweis dar, daß die Wirkung der induzierenden Substanzen auf die δ -Aminolävulin-säure-Synthetase nicht auf einer Änderung der Konformation als allosterischer Übergang am Enzymprotein beruht, sondern, daß sie eine Neusynthese des Enzyms anregen. So wird die erhöhte Bildung von Porphyrinen als Folge einer Derepression derjenigen Enzymsynthese erklärt, die auch im physiologischen Zustand die Quantität nachfolgender anabolischer Synthesesequenzen der betreffenden Stoffwechselkette limitiert. Die Resultate von Tschudy und Mitarbeitern (10), die im Leberzylinder einer an akuter intermittierender Porphyrie erkrankten Patientin eine 7- bis 14fach erhöhte Aktivität der δ -Aminolävulin-säure-Synthetase nachwiesen, stützen die Hypothese, daß die δ -Aminolävulin-säure-Synthetase

physiologischerweise in der Leberzelle durch eine Endprodukt-Repression kontrolliert wird. Mehrere Untersucher fanden, daß die Katalaseaktivität in der Leber bei experimenteller Porphyrurie, die am Versuchstier durch DDC (52, 72) oder Sedormid (66, 70) hervorgerufen wurde, und in der Leber des Menschen bei hepatischer Porphyrurie (72) abfällt (52, 66, 70, 72). Gleichzeitig damit waren der Sauerstoffverbrauch und die Glycin-2-C-Oxydation im Leberhomogenat herabgesetzt (72). Dagegen ging der Gehalt an Katalase in den peripheren Erythrocyten nach Gabe von Sedormid nicht zurück (70). Gleichzeitig mit dem frühen Abfall der Katalase nach Sedormid stiegen die Proto- und Koproporphyrinkonzentrationen in der Leber an, während die Konzentrationen von Uroporphyrin und Porphobilinogen erst später anstiegen, wenn die Katalaseaktivität bereits niedrigere Werte erreicht hatte (70). Die auf Abbildung 6 dargestellte Verminderung der Protohäm- und Erhöhung der Protoporphyrinkonzentration im Verlaufe eines Zellkulturexperiments korreliert sowohl mit diesen Befunden (70) als auch mit den Ergebnissen von GINSBURG und DOWDLE (72), die in der Leber mit DDC vergifteter Ratten dieselbe simultane und umgekehrt proportionale Änderung der Konzentrationen von Protoporphyrin und Katalase feststellten, wobei sich in einem neun Tage dauernden Experiment die Kurven des Katalaseabfalls und Protoporphyrinanstiegs am 4. Tag kreuzten, wie der Abfall des Häms und Anstieg des Protoporphyrins im Leberzellexperiment nach 10 Stdn. (Abb. 6). Die Differenz zwischen den Ergebnissen in vivo und in vitro besteht jedoch darin, daß der Hämgehalt in den Kontrollen der Zellkultur-experimente im Verlauf der Inkubation noch stärker zurückging. Die Veresterung der Tetrapyrrole erfaßt sämtliches in der Zelle nicht kovalent gebundenes Protohäm (s. Methodik). Deshalb wird angenommen, daß der Rückgang der Konzentration des Protohäms mit einer Abnahme der Katalase bereits unter den Kulturbedingungen der Leberzellinkubation erfolgt und hier kein spezifischer Effekt des Pharmakons ist. Hingegen erhielt die mit Meprobramat induzierte Kultur 80% mehr Protohäm als die Kontrolle. Auf die Porphyrinsynthese schwächer wirkende Substanzen führten jedoch nicht zu einer Erhöhung von Protohäm in den Leberzellkulturen. Verschiedene in vivo Versuche zeigten, daß die Hämsynthese in der porphyrischen Leberzelle erhöht ist. In der Leber Sedormid-vergifteter Ratten war die „Leber-Hämatinfraction“ gegenüber dem Normalbereich um 75% angestiegen (66, 70). Andere Autoren fanden eine größere ^{59}Fe -Utilisation der Leber von Mäusen, denen 2-Allyl-2-isopropylacetamid injiziert worden war (52). Dagegen ändert sich der Einbau von ^{59}Fe in das Häm der Leber von mit DDC behandelten Mäusen nicht (52). Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Fettsäuresynthese bei experimenteller Porphyrurie stellten LABBE und Mitarbeiter (53) fest, daß in der porphyrischen Leber sowohl der Einbau von ^{59}Fe ($^{59}\text{FeCl}_3$) als auch von Succinat-[2,3- ^{14}C] und Acetat-[2- ^{14}C] in Häm er-

höht ist. Parallel dazu stieg der Einbau der Vorläufer in Fettsäuren aus Acetat um 100% und aus Succinat um 300% an. Über einen Anstieg des Hämenzyms Tryptophan-Pyrrolase²⁾ in der Leber von Ratten nach Gabe von Sedormid wurde ebenfalls berichtet (73). Zusammenfassend geht aus den Daten über die Hämsynthese nach Applikation porphyrinogener Fremdstoffe in vivo und in vitro hervor, daß ihre Wirkung auf die Porphyrinsynthese weiterhin zu einer höheren Hämsynthese führen kann.

Wie vorausgehend besprochen wurde, steht zur Erklärung des Wirkungsprinzips porphyrinogener Substanzen eine Arbeitshypothese zur Verfügung, die aus den Vorstellungen über die Gen-abhängigen Regulationen der Proteinsynthese entwickelt wurde und die biochemischen Manifestationen experimenteller und angeborener Porphyrrien auf einen einzigen Mechanismus zurückführt: Verlust der Kontrolle über die Bildung des für eine Kette von Reaktionsabläufen limitierenden Enzyms. Im Gegensatz dazu liegen über die Einflüsse auf die Synthese aus δ -Aminolävulinsäure nur Einzel-fakten vor, die allerdings zeigen, daß Steuerungsprozesse auch in diesem Abschnitt der Synthese vorhanden sein müssen. Aber ein einheitliches Konzept über den Regelmechanismus, der die Synthese von der δ -Aminolävulinsäure bis zum Häm umfaßt, ist noch nicht erarbeitet worden. Die rapide Zunahme von Porphyrinen aus zugesetzter δ -Aminolävulinsäure (s. S. 139) bestätigt zunächst nur, daß die an diesen Reaktionen beteiligten Enzyme in der Leberzelle in nicht-begrenzender Menge vorliegen. Aus einer Studie über die Hämsynthese aus δ -Aminolävulinsäure an den Erythrocyten des Menschen (74) ging hervor, daß dieser Synthesezweig multifaktoriell beeinflusst wird. Eine negative feedback-Kontrolle der δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase durch Häm wurde an den Erythrocyten des Menschen (20) und bei Bakterien (15) festgestellt. GRANICK und URATA (56) berichteten, daß die bei hoher g-Zahl gewonnenen Überstände des Leberzellinhalts von Tieren, denen DDC appliziert wurde, 25% mehr Porphobilinogen aus δ -Aminolävulinsäure synthetisierten und 57% mehr Porphobilinogen in Porphyrine konvertierten als die gleiche Zellfraktion von Kontrolltieren. Dagegen fanden sie keine Unterschiede in der Aktivität der Koproporphyrinoydase zwischen Lebermitochondrien behandelter und gesunder Tiere (56). Demzufolge mußten die für die Synthese von Porphobilinogen und Koproporphyrinogen kompetenten Enzyme in den Leberzellüberständen der „DDC-Meerschweinchen“ in erhöhter Aktivität vorhanden gewesen sein. Unter der alleinigen Voraussetzung, daß die Enzyme dieses Syntheseabschnittes in nicht-limitierender Menge gebildet werden, sollten in beiden Inkubaten mit demselben Substratangebot keine Differenzen in der Syntheserate von Porphobilinogen und Porphyrinen eintreten. Eine erhöhte Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase in der Leber von Kaninchen wurde allerdings nach Applikation von Sedormid beschrieben (75, 76). ONISAWA und LABBE zeigten (77), daß die Dehydratase-Aktivität in der Leber

durch die Konzentration der δ -Aminolävulinsäure determiniert und wahrscheinlich direkt durch das Substrat aktiviert wird. Unter Einschluß dieser Beobachtungen bieten sich für den in Abbildung 5 wiedergegebenen Befund einer Mehrsynthese von Porphyrinen aus zugesetzter δ -Aminolävulinsäure unter der Einwirkung bestimmter Pharmaka folgende Erklärungsmöglichkeiten an:

1. Es handelt sich um einen Effekt des Pharmakons analog demjenigen nach in vivo Induktion der Porphyrinsynthese (56, 75, 76), der wahrscheinlich in einem adaptiven Anstieg der δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase besteht.
2. Das Pharmakon wirkt direkt auf die einzelnen Enzyme (52).
3. Beide Wirkungen können sich an verschiedenen Stellen der Synthesekette manifestieren oder auch an einer Reaktionssequenz miteinander interferieren.

Für die letzte Annahme spricht der Befund, daß in der Leberzellkultur sowohl unter Zusatz von Meprobramat als auch von Ätiocholanolon um 30% weniger Protoporphyrin aus δ -Aminolävulinsäure synthetisiert wurden als in Kontrollkulturen, wobei sich diese Differenz allerdings erst in der zweiten Hälfte der Inkubationszeit, also nach 12 Stdn., entwickelte. Auf welche Weise das Pharmakon oder Steroid unter den Bedingungen des Zellkultur-in-vitro-Systems Aktivitätsänderungen der Koproporphyrin-Oxydase herbeiführen können, bleibt noch ungeklärt.

Die Kulturen mit δ -Aminolävulinsäure enthielten nur um 40 bis 60% mehr Häm im Vergleich zur Kontrolle, obwohl eine 100fach höhere Konzentration an Protoporphyrin aus zugesetzter δ -Aminolävulinsäure entstand. Diese Protoporphyrinkonzentration lag jedoch noch zwei Zehnerpotenzen unter dem K_m -Wert von Protoporphyrin für die Häm-Synthetase, wie er von BOTTOMLEY (21) in den Knochenmarkzellen des Menschen ermittelt wurde.

Klinische Aspekte

Von einer großen Zahl verschiedener Pharmaka einschließlich Chemotherapeutika und Antibiotika (1, 41, 43, 78, 79, 80, 81) ist bekannt, daß sie bei Genträgern einer hepatischen Porphyrie eine akute Symptomatik und bei Gesunden sowie im Tierversuch einen Anstieg der Porphyrinsynthese in der Leber und eine Porphyrinurie hervorrufen können. So erwiesen sich in tierexperimentellen Untersuchungen besonders folgende Substanzen als porphyrinogen: Pharmaka der Sedorimid- und Barbituratgruppe (41, 43, 52, 53, 65, 66, 70, 79, 82, 83, 84, 85), 3,5-Dicarbäthoxy-1,4-dihydrocollidin (52, 56, 60, 61, 72, 84, 86, 87), Hexachlorbenzol (79, 88, 89) und niedriger chlorierte Derivate (90), Griseofulvin (67, 68, 69, 91, 92) und 6-Mercaptopurin (93). Beim Menschen sind Störungen der Porphyrinsynthese vorwiegend nach Barbituraten (40, 43, 79, 94), Sulfonamiden (40, 78, 79, 94, 95, 96), Griseofulvin (69, 79, 97), Chloroquin (94, 98), Hexachlorbenzol (79, 99), Äthanol

(40, 79, 94, 100, 101, 102) und Blei (40, 103, 104, 105) aufgetreten. Eine detaillierte Darstellung der sog. toxischen Störungen des Porphyrinstoffwechsels befindet sich in der Monographie von BRUGSCH (40).

Die häufige Koinzidenz von Menstruation und Gravidität und der klinischen Manifestation einer hepatischen Porphyrie (43, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112) weist auf pathogenetische Beziehungen zwischen den weiblichen Sexualhormonen und der Hämsynthese hin. Es wurde darüber berichtet, daß sowohl die Verabreichung von Progesteron (113) als auch von Östrogenen eine akute intermittierende Porphyrie exacerbieren können (114). Äthinylöstradiol (114) und Diäthylstilböstrol (115) führten bei Patienten mit einer akuten intermittierenden Porphyrie zu einer signifikant erhöhten Ausscheidung von δ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen (114) sowie von Uroporphyrin (115). Unter der Malignom-Therapie nicht-porphyrischer Patienten mit Diäthylstilböstrol kam es nicht zu einer erhöhten Ausscheidung von Porphyrinvorstufen und Porphyrinen im Urin (115), im Gegensatz zur Behandlung von Malignomen mit Östrogenen bei einer Porphyria cutanea tarda (110, 116). Dagegen ist bei Gesunden eine primäre Störung der Porphyrinsynthese durch orale Kontrazeptiva, die zu einem erhöhten Vorkommen von δ -Aminolävulinsäure und Koproporphyrin der Isomerenreihe I im Urin führten (117), nicht bewiesen.

Aus der vergleichenden Betrachtung klinischer, tierexperimenteller und aus Leberzellkulturen (Abb. 2 bis 4) erhaltener Ergebnisse folgt, daß sowohl porphyrinogene Pharmaka als auch Steroide wie Progesteron, Östrogene und stereoisomere Steroidmetabolite der 5 β -H-Reihe (cis-Stellung der A:B-Ringe) im Prinzip gleichartig auf den Porphyrinstoffwechsel wirken, indem sie über eine Induktion der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase die Gesamtsynthese stimulieren (11). Auf welche Weise es aber zu den der klinischen, vorwiegend neurologischen (118) Symptomatik zugrunde liegenden pathophysiologischen Störungen bei der akuten intermittierenden Porphyrie kommt, ist noch unklar. Eine von DE MATTEIS und RIMINGTON (119) entworfene Hypothese versucht, diese Störungen auf eine verminderte Synthese von Acetylcholin zurückzuführen, die als Folge einer stärkeren Metabolisierung des Glycins über den SHEMIN-Zyklus (120) entstehen soll, wobei dann weniger aktives Acetat für die Bildung des Acetylcholins bereit stehen würde.

Die Leberzellkultur als ein permanent kontrollierbares und unter identischen Bedingungen mit relativ geringen Variationen reproduzierbares in-vitro-System ist geeignet, Substanzen in ihrer Wirkung auf die Porphyrinsynthese zu erkennen und zu prüfen. Da neben den erwähnten Pharmaka auch Pyrazolidinderivate ein Porphyrie-Syndrom provozieren können (78), haben wir *p*-Hydroxy-phenylbutazon (Abb. 2), einen Metaboliten des Phenylbutazons, in der Leberzellkultur näher untersucht. Die Substanz führte zu einer signifikanten Erhöhung der Porphyrinsynthese (121). Obgleich das Ergebnis nicht direkt auf den Stoffwechsel der Leber des

Rheuma-Diagnostika

Lues-Diagnostika

**Blut - und Serumgruppen-
Testseren**

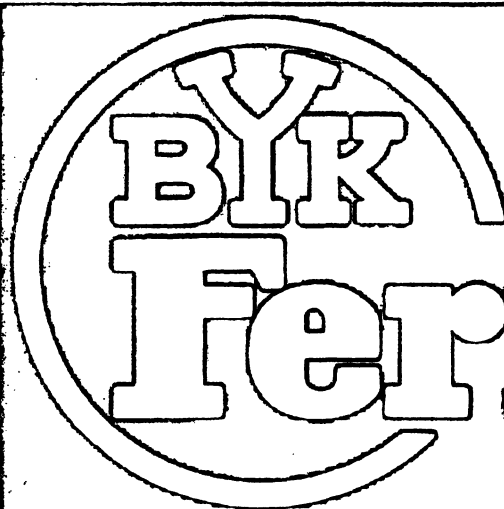
Agglutinierende Seren

Plasmaprotein-Antiseren

Blutderivate

Klin.-chem. Diagnostika

*** Biochemikalien**



Fermotest

*** Biochemikalien**

Nucleoside

und Nucleotide

Coenzyme

und Coenzymanaloge

Enzyme

BYK-GULDEN
LOMBERG · GMBH · KONSTANZ
ABTEILUNG FERMOTEST
HAMBURG

ALOIS J. BEUREN

Die angiokardio- graphische Darstellung kongenitaler Herzfehler

EIN ATLAS

von ALOIS J. BEUREN

Dr. med., ao. Prof. mit Lehrstuhl f. pädiatrische Kardiologie u. Leiter der kardiologischen Abt. der Universitäts-Kinderklinik Göttingen

mit Geleitworten von

Prof. HELEN B. TAUSSIG, M. D.

und Prof. Dr. med. G. JOPPICH

Quart

Mit 285 Abb. in 459 Einzeldarst. XVI, 312 Seiten.
1966. Ganzleinen DM 175,—

ZENTRALBLATT FÜR CHIRURGIE

Der geübte Betrachter wird Freude an dem Studium von Einzelheiten haben, der Anfänger eine gute Information finden. — Zusammenfassend muß man feststellen, daß dieses vom Verfasser konsequent auf Grund großer persönlicher Erfahrung aufgebaute und vom Verlag hervorragend ausgestattete Buch allen Chirurgen empfohlen werden kann, die der operativen Kardiologie nahestehen.

ZENTRALBLATT FÜR DIE GESAMTE RADIOLOGIE

Alles in allem kann gesagt werden, daß es bisher kein Werk gibt, in welchem die angiokardiographische Darstellung angeborener Herzfehler so lückenlos, so verständlich und mit soviel persönlicher Erfahrung beschrieben worden ist. Die ganz hervorragende Ausstattung tut ein übriges, um es dem Ref. leicht zu machen, jeder radiologischen Klinik, jedem radiologischen Institut, aber auch jedem Radiologen überhaupt, die Anschaffung dieses Buches zu empfehlen.



WALTER DE GRUYTER & CO · BERLIN 30

Menschen übertragen werden kann, ist das Pharmakon dennoch als eine potentiell porphyrinogene Substanz zu beurteilen. Auch mit Progesteron und Östradiol wurde in Leberzellkulturen eine stimulierende Wirkung auf die Porphyrinsynthese gefunden (122), die mit den klinischen Beobachtungen über die durch Östrogene und Progesteron induzierte Manifestation hepatischer Porphyrien übereinstimmt. In der Leberzellkultur wirkte Östradiol schwächer als Progesteron.

Die erhöhte Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase in der Leber des Menschen bei akuter intermittierender Porphyrie, bei experimenteller Porphyrie und in den primären Hühnerembryo-Leberzellkulturen lassen einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus in der Hämsynthese erkennen. Die Wirkung der Fremdstoffe auf die Porphyrinsynthese des Laboratoriumstiers und beim Menschen in zeitlicher und quantitativer Hinsicht zeigt jedoch artspezifische Unterschiede, die wahrscheinlich mit dem Metabolismus eines bestimmten Pharmakons in der betreffenden Spezies zusammenhängen (47).

Induktion der Porphyrinsynthese und arzneimittelabbauender Enzyme

Die Induktion der Porphyrinsynthese wird wie die Induktion arzneimittelabbauender Enzyme durch völlig verschiedene chemische Fremdstoffe und auch Steroide (123) in der Leberzelle ausgelöst. Die induzierenden Substanzen sind lipoidlöslich. Beide Induktionsvorgänge sind unspezifische Prozesse. Im folgenden werden noch weitere, zwischen den beiden Reaktionen übereinstimmende Parallelen hervorgehoben:

1. Phenobarbital, das vorwiegend in den Untersuchungen über die Induktion arzneimittelabbauender Enzyme eingesetzt wurde (46, 47, 59), ruft ebenfalls eine experimentelle Porphyrie hervor (85). Es ist anzunehmen, daß auch andere, vorwiegend die arzneimittel-metabolisierenden Enzyme induzierenden Pharmaka ebenfalls die Porphyrinsynthese induzieren. Reziproke Wirkungsverhältnisse auf beide Reaktionen liegen möglicherweise dann vor, wenn ein vorwiegend porphyrinogenes Pharmakon auch die arzneimittelabbauenden Enzyme mit-induziert. Hinweise auf die Induktion arzneimittelabbauender Enzyme durch Substanzen wie Meprobarbitat, Glutethimid und Phenylbutazon, die sich in den Leberzellkulturversuchen als stark porphyrinogen erwiesen, gibt REMMER (47, 124).

2. Sowohl bei experimenteller Porphyrie als auch bei der Induktion der arzneimittelabbauenden Enzyme kommt es zu einer Stimulation des Leberwachstums und zur Hypertrophie der Leber (47, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 58, 67, 68).

3. In beiden Prozessen kommt es zu einer Erhöhung der RNA (54, 124, 125) und der Lipide (50, 54, 124). Die mikrosomalen Phosphatide der Leberzelle stiegen sowohl bei den mit Phenobarbital (124) als auch bei den mit Allylisopropylacetamid (58) behandelten Ratten an. Mit Allylisopropylacetamid war eine hepatische Porphyrie erzeugt worden (58).

4. Beide Prozesse führen zu einer Hypertrophie der glatten Membranen des endoplasmatischen Retikulums (49, 57, 58, 59, 126).

5. Beide Induktionsvorgänge können durch Actinomycin D und Puromycin (127) unterdrückt werden (126). Bei einem ausgelösten Induktionsprozeß geht dann, wenn der Induktor aus dem Experiment wieder entfernt wird, der Anstieg der jeweiligen Syntheseprodukte, Porphyrine (1) oder Cytochrom P-450 (128), wieder zurück.

6. Sowohl in der porphyrischen Leber (53, 68) als auch nach Phenobarbitalbehandlung (124) wird mehr Protohäm in gefunden. Die Analysendaten können nicht direkt verglichen werden, da sie mit verschiedenen Methoden gewonnen wurden. REMMER und MERKER (124) bestimmten Cytochrom b_5 . Mit Meprobarbitat, Glutethimid, Methpyrilon und DDC induzierte Leberzellkulturen enthielten ebenfalls mehr Protohäm. Nach den Befunden von ESTABROOK, COOPER und ROSENTHAL (129) ist an der Hydroxylierung der Pharmaka (130) das von KLINGENBERG (131) in den Mikrosomen der Leberzelle entdeckte Cytochrom P-450 maßgeblich beteiligt (48, 132). Über das Vorkommen von Cytochrom P-450 in den Mikrosomen verschiedener Gewebe und seine Funktion in den Hydroxylierungsreaktionen ist von STRITTMATTER kürzlich referiert worden (133). Cytochrom P-450 trägt Protohäm als prosthetische Gruppe (134). Nach Applikation von Barbituraten kommt es 24 bis 48 Stdn. später zu einem erheblichen Anstieg des Cytochrom P-450 in der Mikrosomenfraktion der Leberzelle (48, 132). Da ein Pharmakon als Stimulus für seine eigene Destruktion wirkt (134), indem es eine Mehrsynthese der mikrosomalen „mixed function oxidases“ (136) anregt, müßte besonders für den Anstieg von Cytochrom P-450 mehr Häm zur Verfügung stehen. Dem Prozeß würde eine Überproduktion von Häm vorangehen, wenn eine mit den mikrosomalen Reaktionsabläufen verbundene de novo Synthese der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase und damit eine Steigerung der Porphyrinsynthese stimuliert werden. Protohäm wird aber nicht nur für das CO-bindende Pigment des Hydroxylasen-Systems, sondern auch für das Cytochrom b_5 benötigt, dessen Konzentration im glatten endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle nach Phenobarbital um das Dreifache anstieg (124). Die Idee von GRANICK (1), daß infolge der Induktion der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase mehr Häm für hydroxylierende Hämoproteine gebildet werden könnte, erhält durch den Nachweis höherer Hämkonzentrationen in den induzierten Leberzellkulturen (Abb. 6) eine experimentelle Stütze.

Eine simultane Induktion der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase und arzneimittelabbauender Enzyme durch Allylisopropylacetamid oder Barbiturate würde die Hypertrophie der glatten Membranen des endoplasmatischen Retikulums bei experimenteller Porphyrie (58) erklären. Der Anstieg der mikrosomalen NADPH-Cytochrom-c-Reduktase (123) bei experimenteller Porphyrie (137, 138) spricht für das Vorkommen einer

gleichzeitigen Induktion der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase und mikrosomaler, an der Metabolisierung von Pharmaka beteiligter Enzyme. Die Rolle der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase als Komponente der oxydativen Demethylierung haben ORRENIUS und ERNSTER (48) nachgewiesen, wobei die Substrat(Pharmaka)-induzierte Aktivierung des Enzyms über eine mRNA-Synthese läuft (48).

Nach neueren elektronenmikroskopischen Untersuchungen (58) wiesen die Mitochondrien der Leberzellen bei experimenteller hepatischer Porphyrie keine Veränderungen auf. Da es nach Applikation porphyrinogener Substanzen zu einer Induktion der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase kommt, die für diese molekulare Störung charakteristisch ist, stellt sich die Frage, ob eine Beziehung zwischen der Proliferation des endoplasmatischen Retikulums und der Mehrsynthese der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase besteht. Die Autoren (58) vermuten, daß die δ -Aminolävulinsäure-Synthetase möglicherweise außerhalb der Mitochondrien am endoplasmatischen Retikulum gebildet, danach zum Mitochondrium transportiert wird und in die Organelle eintritt. Das Vorkommen eines solchen Proteintransports vom endoplasmatischen Retikulum zum Mitochondrium haben KADENBACH (139) sowie PENNIAL und DAVIDIAN (140) für das Cytochrom c beschrieben.

Aus den diskutierten Befunden über die Wirkung von Pharmaka auf die Porphyrinsynthese und die Synthese arzneimittelabbauender Enzyme resultiert, daß wahrscheinlich beide Induktionsprozesse, die von verschiedenen Genen und von verschiedener mRNA reguliert werden, miteinander gekoppelt sein können. So wie ORRENIUS und ERICSSON (126) zwei verschiedene Mechanismen für die Regulation der Enzym- und Membransynthese vorgeschlagen haben, die in vivo eng aufeinander abgestimmt sind, wird für die Derepression der Hämsynthese einerseits und die Induktion mikrosomaler Enzyme, wie insbesondere der Synthese von Cytochrom P-450 und der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase, andererseits ein Konzept auszuarbeiten sein, das die Korrelation zwischen den beiden Mechanismen herstellt.

Die Zellkulturexperimente wurden in den virologischen Laboratorien des Hygiene-Instituts, dank des freundlichen Entgegenkommens von Herrn Dozent Dr. F. LEHMANN-GRUBE, durchgeführt.

Literatur

1. GRANICK, S., J. biol. Chemistry 241, 1359 (1966). — 2. JACOB, F. und J. MONOD, J. Mol. Biol. 3, 318 (1961). — 3. LWOFF, A., Biological Order, M. I. T. Press, Cambridge, Mass. (1962). — 4. POTTER, V. R., in: Advances in enzyme regulation, ed. by G. Weber, Pergamon Press Oxford-London-New York-Paris (1963), Vol. 1, S. 279. — 5. WIELAND, O., in: Molekularbiologie als Fundament der modernen Medizin, J. F. Lehmanns Verlag München (1967) S. 76. — 6. LASCELLES, J., Tetrapyrrole biosynthesis and its regulation, W. A. Benjamin, Inc., New York und Amsterdam (1964). — 7. LASCELLES, J., in: Advances in microbial physiology, ed. by A. H. Rose and J. F. Wilkinson, Academic Press, London und New York (1968), Vol. II, S. 1. — 8. DOSS, M., Biochim. biophysica Acta, Amsterdam 170, 461 (1968). — 9. LEVERE, R. D. und S. GRANICK, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 54, 134 (1965). — 10. TSCHUDY, D. P., M. G. PERLROTH, H. S. MARVER, A. COLLINS, G. HUNTER jr. und M. RECHCIGL jr., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 53, 841 (1965). — 11. GRANICK, S. und A. KAPPAS, J. biol. Chemistry 242, 4587 (1967). — 12. KAPPAS, A. und S. GRANICK, J. biol. Chemistry 243, 346 (1968). — 13. LEVERE, R. D., A. KAPPAS und S. GRANICK, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 58, 985 (1967). — 14. LABBE, R. F., T. KUMURADA und J. ONISAWA, Biochim. biophysica Acta, Amsterdam 111, 403 (1965). — 15. LASCELLES, J., J. gen. Microbiol. 23, 487 (1960). — 16. BURNHAM, B. F. und J. LASCELLES, Biochem. J. 87, 462 (1963). — 17. KARI-BIAN, D. und I. M. LONDON, Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 243 (1965). — 18. WELLAND, F. und H. C. SCHWARTZ, Clin. Research 14, 142 (1966). — 19. VAVRA, J. D., J. clin. Invest. 46, 1127 (1967). — 20. CALISSANO, P., D. BONSIGNORE und C. CARTASEGNA, Biochem. J. 101, 550 (1966). — 21. BOTTOMLEY, S. S., Blood 31, 314 (1968). — 22. DOSS, M., J. Chromatog. 30, 265 (1967). — 23. DOSS, M., diese Z. 6, 498 (1968). — 24. DOSS, M., Abstr. 5th Meeting Federat. of Europ. Biochem. Soc., Prag (1968) S. 118. — 25. DOSS, M., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 1243 (1968). — 26. DOSS, M., Klin. Wschr. 46, 731 (1968). — 27. LEHMANN-GRUBE, F., in: Virus- und Rickettsieninfektionen des Menschen, hrsg. von R. Haas und O. Vivell, J. F. Lehmanns Verlag München (1965) S. 30. — 28. HANKS, J. H. und R. E. WALLACE, Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 71, 196 (1949). — 29. WALLIS, C., R. T. LEWIS und J. L. MELNICK, Texas Rep. Biol. Med. 19, 194 (1961). — 30. EAGLE, H., Science, Washington 130, 432 (1959). — 31. DOSS, M. und U. BODE, diese Z. 6, 383 (1968). — 32. DOSS, M. und U. BODE, J. Chromatog. 35, 248 (1968). — 33. PORRA, R. J. und O. T. G. JONES, Biochem. J. 87, 181 (1963). — 34. FALK, J. E., Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam-London-New York (1964). — 35. SCHLENKER, F. S., N. A. TAYLOR und B. P. KIEHN, Amer. J. clin. Path. 42, 349 (1964). — 36. MAUZERALL, D. und S. GRANICK, J. biol. Chemistry 219, 435 (1956). — 37. DOSS, M., FEBS Letters 2, 127 (1968). — 38. DOSS, M. und H. BÜRGER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 936 (1967). — 39. GOLDBERG, I. H., Amer. J. Med. 39, 722 (1965). — 40. BRUGSCH J., Porphyrine, Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig (1959). — 41. STICH, W., in: Nebenwirkungen von Arzneimitteln auf Blut und Knochenmark, hrsg. von R. Jürgens und J. Waldenström, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1957) S. 36. — 42. STICH, W., in: Grundlagenforschung in ihrer Bedeutung für die Klinische Medizin, Heilmeyer-Symposium, hrsg. von W. Keiderling, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1965) S. 67. — 43. GOLDBERG, A. und C. RIMINGTON, Diseases of porphyrin metabolism, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Ill. USA (1962). — 44. Ciba foundation symposium on porphyrin biosynthesis and metabolism, ed. by G. E. W. WOLSTENHOLME und E. C. P. MILLAR, J. & A. Churchill LTD, London (1955). — 45. RIMINGTON, C., Acta med. scand., Suppl. 445, 11 (1966). — 46. REMMER, H., R. W. ESTABROOK, J. SCHENKMAN und H. GREIM, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path. 259, 98 (1968). — 47. REMMER, H., Dtsch. Med. Wschr. 92, 2001 (1967). — 48. ORRENIUS, S. und L. ERNSTER, Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 60 (1964). — 49. KUNZ, W., G. SCHAUDE, W. SCHMID und M. SIESS, Proc. Europ. Soc. Study of Drug Toxic., Vol. VII, Rom (1966) S. 113. — 50. KUNZ, W., G. SCHAUDE, H. SCHIMASSEK, W. SCHMID und M. SIESS, Proc. Europ. Study of Drug Toxic., Vol. VII, Rom (1966) S. 138. — 51. KUNZ, W., U. GEIBEL und W. SCHULZ, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path. 257, 298 (1967). — 52. ONISAWA, J. und R. F. LABBE, J. biol. Chemistry 238, 724 (1963). — 53. LABBE, R. F., Y. HANAWA und F. I. LOTTSFELDT, Arch. Biochem. Biophysics 92, 373 (1961). — 54. LOTTSFELDT, F. I. und R. F. LABBE, Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 119, 226 (1965). — 55. TADDEINI, L., K. L. NORDSTROM und C. J. WATSON, Metabolism, Baltimore 13,

- 691 (1964). — 56. GRANICK, S. und G. URATA, *J. biol. Chemistry* 238, 821 (1963). — 57. REMMER, H. und H. J. MERKER, *Klin. Wschr.* 41, 276 (1963). — 58. POSALAKI, Z. und T. BARKA, *J. Histochem. Cytochem.* 16, 337 (1968). — 59. ORRENIUS, S., J. L. ERICSSON und L. ERNSTER, *J. Cell Biol.* 25, 627 (1965). — 60. SOLOMON, H. M. und F. H. J. FIGGE, *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 100, 583 (1959). — 61. SOLOMON, H. M. und F. H. J. FIGGE, *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 105, 484 (1960). — 62. GRANICK, S., *J. biol. Chemistry* 238, PC 2247 (1963). — 63. GRANICK, S., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 123, 188 (1965). — 64. WATSON, C. J., *diese Z.* 2, 25 (1964). — 65. SCHMID, R. und S. SCHWARTZ, *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 81, 685 (1952). — 66. SCHMID, R., J. F. FIGEN und S. SCHWARTZ, *J. biol. Chemistry* 217, 263 (1955). — 67. DE MATTEIS, F., *Biochem. J.* 98, 23c (1966). — 68. DE MATTEIS, F. und C. RIMINGTON, *Brit. J. Dermat.* 75, 91 (1963). — 69. WATSON, C. J., Porphyrin metabolism, in: *Diseases of metabolism*, ed. by G. Duncan, W. B. Saunders Company, Philadelphia und London (1965) S. 850. — 70. SCHMID, R. und S. SCHWARTZ, in: *l. c.* 44, S. 196. — 71. Doss, M., unveröffentlichte Ergebnisse. — 72. GINSBURG, A. D. und E. B. DOWDLE, *S. Afr. J. Laborat. clin. Med.* 9, 206 (1963). — 73. GREENGARD, P. und P. FEIGELSON, *Amer. Chem. Soc. Abstracts*, 18, 7C (1961). — 74. HEILMEYER, L., R. CLOTTEN und L. HEILMEYER jr., *Die Störungen der Bluthäm-synthese mit besonderer Berücksichtigung der sideroachrestischen Anämien und erythropoetischen Porphyrrien*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1964). — 75. TANCIONI, A., H. A. TIGIER und M. GRINSTEIN, *Biochem. Pharmacol.* 13, 1095 (1964). — 76. GIBSON, K. D., in: *l. c.* 44, S. 27. — 77. ONISAWA, J. und R. F. LABBE, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 56, 618 (1962). — 78. FILIPPINI, L., *Dtsch. Med. Wschr.* 91, 959 (1966). — 79. SCHMID, R., *S. Afr. J. Laborat. clin. Med.* 9, 212 (1963). — 80. GRANICK, S., *J. Amer. Med. Ass.* 190, 475 (1964). — 81. STROHMEYER, G., *Münch. med. Wschr.* 110, 1275 (1968). — 82. STICH, W. und P. DECKER, in: *l. c.* 44, S. 254. — 83. STICH, W., *Klin. Wschr.* 36, 386 (1958). — 84. HAEGER-ARONSON, B., *Acta pharmacol. (K'hnv)* 18, 165 (1961). — 85. TALMAN, E. L., J. D. CASE, R. A. NEVÉ, R. F. LABBE und R. A. ALDRICH, *J. biol. Chemistry* 212, 663 (1955). — 86. DE MATTEIS, F. und B. E. PRIOR, *Biochem. J.* 83, 1 (1962). — 87. DE MATTEIS, F., T. F. SLATER und D. Y. WANG, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 68, 100 (1963). — 88. CAMPBELL, J. A. H., *S. Afr. J. Laborat. clin. Med.* 9, 203 (1963). — 89. OCKNER, E. K. und R. SCHMID, *Nature London* 189, 499 (1961). — 90. RIMINGTON, C. und G. ZIEGLER, *Biochem. Pharmacol.* 12, 1387 (1963). — 91. GAJDOS, A. und M. GAJDOS-TÖRÖK, *Nature London* 206, 297 (1965). — 92. OWENS, C. W. I., *Brit. J. Dermat.* 76, 81 (1964). — 93. GAJDOS, A., in: *l. c.* 42, S. 99. — 94. RIMINGTON, C., *Proc. roy. Soc. Med.* 57, 511 (1964). — 95. SANDBERG, C. G. und L. WETTERBERG, *Scand. J. clin. Laborat. Invest.* 20, 176 (1967). — 96. VANNOTTI, A., *Porphyrins: their biological and chemical importance*, Hilger and Watts, London (1954). — 97. RIMINGTON, C., P. N. MORGAN, K. NICHOLS, J. D. EVERALL und R. R. DAVIES, *Lancet*, London 1963/II, 318. — 98. SWEENEY, G. D., S. J. SAUNDERS, E. B. DOWDLE und L. EALES, *Brit. med. J.* 1965/I, 1281. — 99. PETERS, H. A., S. A. M. JOHNSON, S. CAM, S. ORAL, Y. MÜFTÜ und T. ERGENE, *Amer. J. Med. Sci.* 251, 314 (1966). — 100. SUTHERLAND, D. A. und C. J. WATSON, *J. Laborat. clin. Med.*, S. Louis 37, 29 (1951). — 101. WATSON, C. J., D. A. SUTHERLAND und V. HAWKINSON, *J. Laborat. clin. Med.*, S. Louis 37, 8 (1951). — 102. CREUTZFELDT, W., K. BECK, R. CLOTTEN und L. BRIANCHI, *Acta hepato-splenol.* 13, 65 (1966). — 103. CHISHOLM, J. J., *J. Pediatr.*, S. Louis 64, 174 (1964). — 104. GUTNIAK, O., H. KOZIOŁOWA und E. KOWALSKI, *Lancet*, London 1964/I, 1137. — 105. DAGG, J. H., A. GOLDBERG, A. LOCHHEAD und J. A. SMITH, *Quart. J. Med.*, New Series XXXIV, 163 (1965). — 106. HUBER, F. B., *Schweiz. med. Wschr.* 97, 1498 (1967). — 107. HUBER, F. B., *Schweiz. med. Wschr.* 96, 818 (1966). — 108. ZIMMERMANN, T. S., J. M. McMILLIN und C. J. WATSON, *Arch. intern. Med.* 118, 229 (1966). — 109. HOPMANN, R., *Dtsch. Med. Wschr.* 93, 76 (1968). — 110. VAIL, J. T., *J. Amer. med. Ass.* 201, 671 (1967). — 111. WATSON, C. J., W. RUNGE und I. BOSSENMAIER, *Metabolism*, Baltimore 11, 1129 (1962). — 112. PERLROTH, M. G., H. S. MARVER und D. P. TSCHUDY, *J. Amer. med. Ass.* 194, 1037 (1965). — 113. LEVIT, E. J., J. H. NODINE und W. H. PERLOFF, *Amer. J. Med.* 22, 831 (1957). — 114. WELLAND, F. H., E. S. HELLMAN, A. COLLINS, G. W. HUNTER und D. P. TSCHUDY, *Metabolism*, Baltimore 13, 251 (1964). — 115. THEOLOGIDES, A., B. J. KENNEDY und C. J. WATSON, *Metabolism*, Baltimore 13, 391 (1964). — 116. MONCKTON COPEMAN, P. W., D. J. CRIPPS und R. SUMMERLY, *Brit. med. J.* 1966/I, 461. — 117. KOSKELO, P., A. EISALO und I. TOIVONEN, *Brit. med. J.* 1966/I, 652. — 118. MATTAR-VAHAR, H. und E. LUNGERSHAUSEN, *Dtsch. Med. Wschr.* 92, 1809 (1967). — 119. DE MATTEIS, F. und C. RIMINGTON, *Lancet*, London 1962/I, 1332. — 120. SHEMAIN, D., in: *l. c.* 44, S. 4. — 121. Doss, M., *Z. Naturforsch.* 24b, 143 (1969). — 122. Doss, M., *Klin. Wschr.* 47, 228 (1969). — 123. REMMER, H., *Proc. Europ. Soc. Study of Drug Toxic.*, Vol. IV, Cambridge (1964). — 124. REMMER, H. und H. J. MERKER, *Science*, Washington 142, 1657 (1963). — 125. COWGER, M. L., R. F. LABBE und M. SEWELL, *Arch. Biochem. Biophysics* 101, 96 (1962). — 126. ORRENIUS, S. und J. L. E. ERICSSON, *J. Cell Biol.* 28, 181 (1966). — 127. CONNEY, A. H., A. G. GILMAN, *J. biol. Chemistry* 238, 3682 (1963). — 128. ORRENIUS, S., *J. Cell Biol.* 26, 725 (1965). — 129. ESTABROOK, R. W., D. Y. COOPER und O. ROSENTHAL, *Biochem. Z.* 338, 741 (1963). — 130. BRODIE, B. B., in: *Ciba foundation symposium on enzymes and drug action*, ed. by J. L. Mongar und A. V. S. de Reuck, J. & A. Churchill LTD, London (1962), S. 317. — 131. KLINGENBERG, M., *Arch. Biochem. Biophysics* 75, 376 (1958). — 132. REMMER, H. und H. J. MERKER, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 123, 79 (1965). — 133. STRITTMATTER, P., in: *Biological oxidations*, ed. by T. P. Singer, Interscience Publishers (1968) S. 171. — 134. OMURA, T. und R. SATO, *J. biol. Chemistry* 239, 2370 (1964). — 135. KNOX, W. E., in: *l. c.* 130, S. 245. — 136. MASON, H. S., *Mechanisms of oxygen metabolism*, *Adv. Enzymol.* 19, 79 (1957). — 137. NARISAWA, K. und G. KIKUCHI, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 99, 580 (1965). — 138. NARISAWA, K. und G. KIKUCHI, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 123, 596 (1966). — 139. KADENBACH, B., *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 138, 651 (1967). — 140. PENNIALT, R. und N. DAVIDIAN, *FEBS Letters* 1, 38 (1968).

Dr. M. Doss
355 Marburg/Lahn
Pilgrimstein 2